

学位論文
Doctoral Thesis

関節軟骨変性における C/EBP homologous protein の役割
(The role of C/EBP homologous protein in cartilage degeneration)

上原 悠輔
Yusuke Uehara

熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻運動骨格病態学

指導教員

水田 博志 教授
熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻整形外科学

2015年3月

学 位 論 文

Doctoral Thesis

論文題名 : 関節軟骨変性における C/EBP homologous protein の役割
(The role of C/EBP homologous protein in cartilage degeneration)

著者名 : 上原 悠輔
(単名) Yusuke Uehara

指導教員名 : 熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻整形外科学 水田 博志 教授

審査委員名 : 代謝内科学教授 荒木 栄一
生体微細構築学教授 浴野 成生
皮膚病態治療再建学教授 尹 浩信
耳鼻咽喉科・頭頸部外科学教授 湯本 英二

2015年3月

目次

1. 要旨	3
2. 発表論文リスト	4
3. 謝辞	5
4. 略語一覧	6
5. 研究の背景と目的	
5-1. 変形性膝関節症	8
5-2. 関節軟骨の構造	9
5-3. OA 軟骨の病理学的変化	9
5-4. 軟骨基質の代謝	10
5-5. 軟骨細胞のアポトーシス	10
5-6. 小胞体ストレス応答	11
5-7. 小胞体ストレスと軟骨変性	12
5-8. 目的	13
6. 研究の方法	
6-1. 実験動物	14
6-2. マウス変形性膝関節症モデルにおける解析	14
6-2-1. 変形性膝関節症モデルの作製	
6-2-2. 組織標本作製	
6-2-3. 組織染色法	
6-3. マウス培養軟骨細胞における解析	17
6-3-1. 軟骨細胞の培養	
6-3-2. 小胞体ストレスの誘導	
6-3-3. RNA 抽出と cDNA 作製	
6-3-4. Real-time RT-PCR	

6-3-5. RT-PCR	
6-3-6. Western blotting	
6-3-7. TUNEL 染色と caspase-3 の免疫染色	
6-3-8. ELISA	
6-4. 統計学的解析	20
7. 研究結果	
7-1. マウス変形性膝関節症モデルにおける解析	21
7-1-1. 軟骨変性度の評価	
7-1-2. アポトーシスの評価	
7-1-3. 小胞体ストレスの評価	
7-1-4. 軟骨代謝機能の評価	
7-2. マウス培養軟骨細胞における解析	24
7-2-1. 小胞体ストレスの評価	
7-2-2. アポトーシスの評価	
7-2-3. 軟骨細胞の代謝機能の評価	
8. 考察	26
9. 結語	31
10. 図表	32
11. 参考文献	42

1. 要旨

[目的] 日常臨床で多く遭遇する運動器疾患の一つである変形性膝関節症（膝 OA）は、軟骨変性を主体とした病態である。軟骨変性の病態における分子メカニズムは未だ十分に明らかにされていないが、近年小胞体ストレスとの関連性が指摘されている。我々は、ヒト OA 軟骨において、軟骨変性の進行とともに軟骨細胞のアポトーシスと小胞体ストレス性アポトーシスの誘導因子 CHOP の発現が増加することを報告した。しかし、軟骨変性における CHOP の直接的な役割は不明である。本研究の目的は、*Chop* 遺伝子欠損 (*Chop*^{-/-}) マウスの OA モデルと初代培養軟骨細胞を用いて、軟骨変性と軟骨細胞アポトーシスにおける CHOP の役割を明らかにすることである。

[方法] 野生型 (*Chop*^{+/+}) と *Chop*^{-/-} マウスに対して、膝の内側側副靭帯切離と内側半月板切除による OA モデルを作製し、軟骨変性、小胞体ストレスおよびアポトーシスの程度を評価した。また、両マウスの関節軟骨より単離した軟骨細胞に対して、小胞体ストレス誘導剤 Tunicamycin (TM) を投与後、小胞体ストレス、アポトーシスおよび軟骨細胞機能について評価した。

[結果] マウス OA モデルにおいて、*Chop*^{+/+} マウスでは軟骨変性の進行とともに CHOP が増加し、小胞体ストレスマーカー GRP78 と XBP1s が増加した。また、変性に伴って、アポトーシスの誘導を示す断片化 DNA と活性型 caspase-3 が増加し、II 型コラーゲン (COL2) の低下と MMP13 の増加を認めた。*Chop*^{-/-} マウスでは、*Chop*^{+/+} マウスと比較して GRP78 と XBP1s に差はなかったが、軟骨変性の進行が抑制され、アポトーシスの増加、COL2 の低下、および MMP13 の増加が抑制された。細胞培養系では、*Chop*^{+/+} マウスの軟骨細胞に TM を投与すると、*Chop*、*Grp78* および *Xbp1s* mRNA とアポトーシスが増加し、アグリカン (*Acan*) と *Col2a1* mRNA の低下、および *Mmp13* mRNA の増加を認めた。*Chop*^{-/-} マウスでは、*Chop*^{+/+} と比較して *Grp78* と *Xbp1s* mRNA の増加に差はなかったが、アポトーシスの増加、*Acan* と *Col2a1* mRNA の低下、および *Mmp13* mRNA の増加が抑制された。

[考察] *in vivo* において、*Chop*^{-/-} マウスではアポトーシスの抑制と同時に軟骨変性の進行が抑制されていたことから、Chop を介したアポトーシスが軟骨変性の進行に関与することが明らかとなった。また、*in vitro* において、*Chop*^{-/-} マウスでは小胞体ストレス性アポトーシスの抑制と同時に軟骨細胞の同化作用低下と異化作用亢進が抑制されていたことから、CHOP を介したアポトーシスが軟骨細胞機能に重要な役割を有することが示された。

[結論] CHOP を介した小胞体ストレス性アポトーシスが軟骨変性の進行に寄与し、CHOP が OA の病態に重要な役割を担っていることが明らかとなった。

2. 発表論文リスト

関連論文

Yusuke Uehara, Jun Hirose, Soichiro Yamabe, Nobukazu Okamoto, Tatsuya Okada, Seiichi Oyadomari
and Hiroshi Mizuta.

Endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis contributes to articular cartilage degeneration via C/EBP
homologous protein

Osteoarthritis Cartilage. 22: 1007-1017, 2014.

その他の論文

Takada, K., Hirose, J., Yamabe, S., Uehara, Y., and Mizuta, H.

Endoplasmic reticulum stress mediates nitric oxide-induced chondrocyte apoptosis.

Biomed. Rep. 1: 315-319. 2013.

Yamabe, S., Hirose, J., Uehara, Y., Okada, T. Okamoto, N., Oka, K., Taniwaki, T.,

and Mizuta, H.

Intracellular accumulation of advanced glycation end products induced apoptosis via endoplasmic reticulum
stress in chondrocytes.

FEBS J. 280: 1617-1629, 2013

3. 謝辞

本研究を完遂するにあたり、数多くの御指導、御鞭撻を賜りました熊本大学大学院生命科学研究部整形外科学分野の水田博志教授に深く感謝致します。

また、研究全般に渡り、直接の御指導と御助言を頂きました熊本大学医学部附属病院医療情報経営企画部の廣瀬隼准教授に深く感謝申し上げます。

4. 略語一覽

ADAMTSs	: a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs
ANOVA	: analysis of variance
ATF6	: activating transcription factor-6
Bax	: bcl-2-associated X protein
Bcl-2	: B-cell lymphoma 2
Bim	: bcl-2 interacting mediator of cell death
CC3	: cleaved caspase-3
cDNA	: cyclic deoxyribonucleic acid
CHOP	: C/EBP homologous protein
COL2	: collagen type II
Col2a1	: collagen type II, alpha1
DAB	: 3,3-diaminobenzide tetrahydrochloride
DMEM	: Dulbecco's modified Eagle's medium
DMOAD	: disease-modifying osteoarthritis drug
ECM	: extracellular matrix
EDTA	: ethylenediaminetetraacetic acid
eIF2 α	: eukaryotic initiation factor 2, alpha
ELISA	: enzyme-linked immunosorbent assay
ERAD	: endoplasmic reticulum-associated degradation
FBS	: fetal bovine serum
Gapdh	: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GRP78	: glucose regulated protein 78
HCl	: hydrochloric acid
IGF-1	: insulin-like growth factor 1
IgG	: immunoglobulin G
IL-1 β	: interleukin 1, beta
IL-8	: interleukin 8
IRE1 α	: inositol-requiring protein-1, alpha
JNK	: c-Jun N-terminal kinase
MCP	: monocyte chemo attractant protein
MFC	: medial femoral condyle

MMP13	: matrix metalloproteinase-13
MTP	: medial tibial plateau
NaCl	: sodium chloride
NO	: nitric oxide
OA	: osteoarthritis
PAGE	: polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	: phosphate buffered saline
PDGF	: platelet derived growth factor
PERK	: protein kinase RNA-like ER kinase
PFA	: paraformaldehyde
PVDF	: polyvinylidene fluoride
PG	: proteoglycan
PI	: propidium iodide
QOL	: quality of life
RNA	: ribonucleic acid
ROS	: reactive oxygen species
SDS	: sodium dodecyl sulfate
TBS	: Tris-buffered saline
TGF- β	: transforming growth factor, beta
TM	: tunicamycin
TNF- α	: tumor necrosis factor, alpha
TUNEL	: terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate nick-end labelling
UPR	: unfolded protein response:
XBP1	: x-box binding protein-1
XBP1s	: Xbp1 spliced form
XBP1u	: Xbp1 unspliced form

5. 研究の背景と目的

5-1. 変形性膝関節症

変形性膝関節症（膝 OA）は、関節軟骨をはじめとする関節構成体のすべてに退行性変化を生じる代表的な運動器疾患の一つである。主な症状は疼痛であり、初期には運動開始時や起立時に出現する。病態の進行とともに歩行中の疼痛や安静時痛を認めるようになる。関節痛とともに、膝関節の腫脹や可動域制限、関節水腫、変形などを呈するようになり、しだいに生活の質（QOL）が低下する。これらの症状がさらに増強し、運動機能の障害を生じて移動能力の低下が進行すると、ロコモティブシンドロームをきたして介護が必要になるリスクが高くなる。厚生労働省が行った国民生活基礎調査[1]によると、関節疾患は要支援になる原因の第1位であり、健康寿命を脅かす大きな要素となっている。2005年に開始された運動器疾患をターゲットとした縦断的コホート研究 Research on Osteoarthritis Against Disability [2]では、わが国では X 線像で変性変化を認めるものが推定 2530 万人に及ぶことが報告された。今後高齢化の進行によって OA 患者の増加が予想されることから、OA に対して適切な予防や治療などの対策を講じることは健康寿命の延伸にとって極めて重要である。

膝 OA に対してまず保存療法が行われる。保存療法には、消炎鎮痛剤の内服や外用、高分子ヒアルロン酸や副腎皮質ステロイドの関節内注入などの薬物療法、サポーターや足底板などの装具療法、大腿四頭筋訓練や可動域訓練などの運動療法がある。これらの治療によって症状の改善がないものに対しては、人工膝関節置換術や高位脛骨骨切り術といった手術療法がおこなわれる。しかしながら、これらの治療法は症状の緩和を主眼

としており、OA の発症と進行を抑制するものではない。OA に対する根本的治療が未だ確立されていないのは、病態の発症と進行の分子メカニズムが十分に解明されていないことに起因する。

5-2. 関節軟骨の構造

関節軟骨はヒトで約 2~4 mm の厚みを持つ硝子軟骨であり、数%の軟骨細胞と豊富な細胞外基質（ECM）より構成されている。ECM は湿重量の約 70%を水分が占めており、水分以外では乾燥重量でコラーゲンが約 50%、アグリカンなどのプロテオグリカン（PG）が約 30-35%、非コラーゲン性蛋白や糖蛋白質が約 15-20%含まれている[3]。関節軟骨は、表層から浅層、中間層、深層、石灰化層の 4 層構造を呈し（図 1A）、関節運動における潤滑性と荷重緩衝に関与している[4]。軟骨基質におけるコラーゲンのほとんどを占める II 型コラーゲンは、3 本のポリペプチド鎖がらせん状の構造を呈し、その線維がネットワークを形成することで軟骨の形態保持の役割を担っている。アグリカンは、直線状のコアプロテインにケラタン硫酸とコンドロイチン硫酸が結合した構造をとり、コアプロテインの G1 領域でヒアルロン酸に結合する大型の PG である[5]。コラーゲンが形成したネットワークの間に PG の凝集体、ヒアルロン酸および水分が含まれることで（図 1B）、関節軟骨は粘弾性を有し圧縮力に強い構造を保っている。

5-3. OA 軟骨の病理学的変化

OA の病態は、軟骨下骨、靭帯、半月板などを含む関節構成体の退行性変化であるが、

関節軟骨の変性が病変の主体とされる。OA 軟骨の病理像は、軟骨基質の浮腫の出現に始まり、次いで表面の不整、線維化、および垂直あるいは水平方向への亀裂が生じ、亀裂の周囲ではプロテオグリカンが減少する（図 2）。亀裂の進展に伴って、プロテオグリカンの減少は中間層から深層に拡大する。さらに進行すると基質の構造は破壊され、関節軟骨の基質が菲薄化しやがて消失して軟骨下骨が関節腔に露出する。その表面は関節運動により研磨され、象牙様変化を呈する。

5-4. 軟骨基質の代謝

膝 OA の発症・進展には、性別、人種などの遺伝的な背景や軟骨下骨の骨代謝異常など多数の因子の関与が指摘されているが、その主体は加齢性的変化を受けた軟骨組織に、長期間にわたる力学的負荷が蓄積した結果生じる軟骨基質の分解と破壊である[6, 7]。軟骨基質がダメージを受けると、IL-1 β 、TNF- α などの炎症性サイトカインや、IL-8 や MCP などのケモカイン、活性酸素種（ROS）、破壊された基質の断片、基質分解酵素である MMP13 や ADAMTS の産生が亢進し、軟骨基質の分解が促進される（異化作用）[3, 8, 9]。一方で、TGF- β 、IGF-1、PDGF などの成長因子の発現が亢進し、軟骨基質の修復が促進される（同化作用）[10]。ECM の恒常性は、異化作用と同化作用の均衡が保たれることで維持されている。しかし、これらのバランスが崩れ基質の分解が亢進すると、軟骨の変性をきたす[3, 8, 9]。

5-5. 軟骨細胞のアポトーシス

軟骨細胞は、関節軟骨に存在する唯一の細胞であり、同化作用と異化作用のバランスを調節し、軟骨の恒常性を維持している[11, 12]。これまでの報告から、ECMの代謝機能の不均衡には、軟骨細胞の死が密接にかかわっていることが明らかとなっている[13, 14]。ヒトOA軟骨の変性度の進行とともに軟骨細胞アポトーシスが増加する[15]。また、マウスOAモデルに対し、アポトーシスの中心的な制御因子であるタンパク分解酵素 caspases の抑制剤 Z-VAD-FMK を投与するとアポトーシスが減少し、軟骨変性が抑制される[16]。軟骨細胞がアポトーシスを来す原因には、過剰な力学的ストレス、基質の損傷、ROS、炎症性サイトカイン、および一酸化窒素（NO）などが知られている[14]。これらの刺激を受けた細胞は、death ligand/receptor 経路の活性化やミトコンドリアの膜透過性の亢進をきたし、caspase-3、8、あるいは9の活性化を介してアポトーシスに至る[17, 18]。

5-6. 小胞体ストレス応答

近年、細胞がアポトーシスに至る経路として、小胞体ストレスによるものが注目されている。小胞体は分泌蛋白の成熟を担う細胞内小器官である。リボソームから小胞体に移送された新生蛋白は、GRP78 を代表とする小胞体シャペロンの作用によって折りたたまれ、高次構造を形成する[19, 20]。高次構造が正常に形成されていない異常な蛋白質は細胞質内に送り出され、ユビキチン・プロテアソーム系によって分解除去される（ERAD）。しかし、この折りたたみ機能や分解機構が破綻した場合、小胞体の処理能力の容量を超えて蛋白が小胞体内に送り出された場合、あるいは遺伝子変異により正常に折りたたむことができない蛋白質が合成された場合には、小胞体内に高次構造の異常

な蛋白質が蓄積する。この状態が小胞体ストレスである[21]。

小胞体ストレス下で細胞は、小胞体膜上に存在するセンサー蛋白（PERK、IRE1 α 、ATF6）を活性化し、小胞体ストレス応答（UPR）を誘導する[21]（図2）。小胞体ストレスを感知すると PERK は多量体となり自己リン酸化し、eIF2 α のリン酸化を促進することで新生蛋白の翻訳を抑制する。IRE1 α は二量体化しリン酸化された後、*XBPI* mRNA のスプライシングを促進する。これにより発現した *XBPIs* mRNA は転写因子である XBP1 蛋白を誘導し、GRP78 の発現を促進して小胞体における折りたたみ機能を向上させる。また、XBP1 蛋白は ERAD 関連分子の発現を増加させることにより、異常蛋白の分解除去を促進する。ATF6 はゴルジ体へ輸送後切断され、N 末端が核内に移行し小胞体シャペロンを誘導する。細胞はこれらの UPR により異常蛋白の蓄積を改善し、蛋白質の恒常性を維持する。しかし、小胞体ストレスと UPR のバランスが崩れると CHOP や JNK の発現が増加し、細胞はアポトーシスへ陥る。この小胞体ストレス性アポトーシスは、糖尿病、神経変性疾患、腸炎、および心疾患など様々な病態の進行に関与することが報告されている[22-24]。

5-7. 小胞体ストレスと軟骨変性

OA 患者から採取した変性軟骨では、正常軟骨より GRP78 の発現が増加し[25, 26]、培養軟骨細胞では小胞体ストレスを誘導するとアグリカンと II 型コラーゲンの発現が低下し[27]、*MMP13* の mRNA 発現が増加する[28]。これらは軟骨変性の進行に小胞体ストレスが関与することを示唆する。我々は、先行研究でヒト OA 軟骨とラット OA モデルの

軟骨において、軟骨変性度と軟骨細胞の小胞体ストレスマーカーの発現、軟骨細胞の同化作用、およびアポトーシスの関連性を解析した[29]。その結果、変性軟骨では XBP1s、リン酸化 PERK、ユビキチン、および CHOP の発現が亢進することを示した。さらに、小胞体ストレスは変性の進行とともに増加し、同化作用の低下とアポトーシスの増加に関与することを明らかにした。また、ラット軟骨細胞において、小胞体ストレス性アポトーシスに重要な因子である CHOP に注目して研究を行い、ラット軟骨細胞において、*Chop* 遺伝子発現を抑制することにより、NO 誘導性の小胞体ストレス性アポトーシスが抑制されることを報告した[30]。つまり、軟骨細胞における小胞体ストレス性アポトーシスが軟骨変性に関与する過程において、CHOP が重要な役割を果たしている可能性がある。しかし、これまで *Chop* 遺伝子欠損 (*Chop*^{-/-}) マウスにおける小胞体ストレスやアポトーシスの解析は行われておらず、これらと軟骨変性の関連性について十分に検討されていない。

5-8. 目的

本研究の目的は、アポトーシスと軟骨変性に及ぼす CHOP の直接的な役割を *Chop* 遺伝子の欠損によって個体レベルで明確にすることである。まず、*Chop*^{-/-} マウスにおいて OA モデルを作製して小胞体ストレス、アポトーシスおよび軟骨変性の程度を評価し、それぞれを野生型マウスと比較した。次に、*Chop*^{-/-} 軟骨細胞を用いて、小胞体ストレス性アポトーシスにおける CHOP の果たす役割を解析した。

6. 研究の方法

6-1. 実験動物

実験動物に使用されたすべての野生型 C57BL/6J マウス (*Chop*^{+/+} マウス) は日本 SLC (Hamamatsu, Japan) より購入した。*Chop*^{-/-} マウス[31]は熊本大学大学院生命科学研究部分子遺伝学分野 (Kumamoto, Japan) から供給された。本研究は熊本大学動物実験指針により認可された。

6-2. マウス変形性膝関節症モデルにおける解析

6-2-1. 変形性膝関節症モデルの作製

マウス OA モデルは Kamekura ら[32]の報告に従い外科的に作成した。8 週齢雄の *Chop*^{+/+} マウスと *Chop*^{-/-} マウスにペントバルビタールの腹腔内投与により全身麻酔にかけ、右膝関節には関節包を切開後、内側側副靭帯切離と内側半月板切除を行った。左膝関節には関節包切開のみの sham 手術を施行した。膝関節を含む骨軟骨組織を術後 0 (術直後)、4、8、および 12 週に摘出した。

6-2-2. 組織標本作製

摘出した組織を 4% PFA を用いて 4°C で 18 時間固定した。次に組織を 70% エタノールで一晩かけて脱脂した後に、10% EDTA に浸して 4°C で 2 週間かけて脱灰した。組織をパラフィン包埋した後、膝関節内側の荷重部中央を中心に 4 μm の前額断の組織切片を薄切し、連続した切片を各染色に使用した。

6-2-3. 組織染色法

Safranin-O染色

組織切片をSafranin O-fast greenによって染色し、光学顕微鏡で評価した。各組織切片における軟骨変性の組織学的重症度は、modified Mankin score [33]を用いて半定量的に評価した。このスコアは、関節軟骨の構造、tidemarkの二重化、Safranin-O染色、線維軟骨、非石灰化層における軟骨細胞のクローン化、石灰化層における肥大軟骨細胞、および軟骨下骨の7つの要素を点数化したものであり、観察者バイアスを避けるために実験グループをブラインドにし、2人の観察者によって点数をつけ、その合計点を算出して評価に用いた。

TUNEL 染色

TUNEL 染色は、*in situ* Cell Death Detection Kit, AP (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) を用いて行われた。組織標本に TUNEL solution を 37°C で 1 時間加え、対比染色は PI (Invitrogen, Carlsbad, CA) を用いて行った。組織標本を暗視野にて共焦点レーザー顕微鏡 FV300 (Olympus, Tokyo, Japan) で観察し、全細胞数と陽性細胞数をカウント後、陽性細胞率を算出することでアポトーシスを半定量的に評価した。

免疫染色

CHOP、XBP1s、GRP78、CC3、COL2、およびMMP13の発現レベルは免疫染色法により評価した。ウサギ抗CHOP polyclonal 抗体とヤギ抗GRP78 抗体は Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA) から、ウサギ抗 XBP1s polyclonal 抗体は BioLegend (San Diego, CA) から、ウサギ抗 CC3 monoclonal 抗体は Cell Signaling Technology (Danvers, MA) から、ウサギ抗 COL2 抗体とウサギ抗

MMP13 抗体は Abcam (Cambridge, UK) からそれぞれ入手した。Histofine MAX-PO (R) と Histofine MAX-PO (G) は Nichirei Bioscience Inc. (Tokyo, Japan) から、Alexa Fluor[®]488 は Invitrogen から、それぞれ 2 次抗体として入手した。組織切片を脱パラフィン化した後、徐々に親水化した。組織の抗原賦活化のため、proteinase K (Dako, Glostrup, Denmark) を室温で 15 分間加えた後、PBS で洗浄した。内因性ペルオキシダーゼ活性を阻害するため、切片を 0.3% 過酸化水素/エタノールに室温で 30 分間培養した後、PBS で洗浄した。非特異的結合部位に抗体の結合を阻害するため、CHOP、XBP1s、CC3、COL2 および MMP13 染色用の組織切片には正常ヤギ血清 (Nichirei Bioscience Inc.) を、GRP78 染色用の切片には正常ウサギ血清 (Nichirei Bioscience Inc.) をそれぞれ室温で 30 分間培養した。その後、組織切片を PBS で希釈した 1 次抗体 (CHOP; 1:200、XBP1s; 1:200、GRP78; 1:300、CC3; 1:500、COL2; 1:200、MMP13; 1:200) を 4°C で 18 時間培養した。PBS で洗浄した後、CHOP に対する 2 次抗体は Alexa Fluor[®]488 が、XBP1s、CC3、COL2、および MMP13 に対する 2 次抗体は Histofine MAX-PO (R) を、GRP78 に対する 2 次抗体は Histofine MAX-PO (G) をそれぞれ使用し、室温で 30 分間培養した。CHOP 抗体の組織切片は PI で対比染色し、暗視野にて共焦点レーザー顕微鏡 FV300 にて観察した。その他の抗体の染色性は DAB (Invitrogen) で可視化され、Hematoxylin で対比染色後、光学顕微鏡にて観察した。1 次抗体を使用せずに同様の処理を行った組織切片を陰性コントロールとした。COL2 の発現は、H-score [34]によって半量的に評価した。このスコアは、全面積に対する染色陽性面積の割合の平均と、陰性=0、弱陽性=1、中等度陽性=2、強陽性=3 に分類した染色強度の積を総和して算出したものである。COL2 以外の各タンパクの発現レベルは、TUNEL 染色と同様に陽性細胞率によって半定的に評価した。

6-3. マウス培養軟骨細胞における解析

6-3-1. 軟骨細胞の培養

5週齢、雄の*Chop*^{+/+}と*Chop*^{-/-}マウスの膝関節と股関節から関節軟骨を採取し、0.25% trypsin/EDTA (Gibco, Gaithersburg, MD) と0.2% collagenase type II (Gibco) で37°C、2時間培養することで軟骨細胞を酵素的に単離した。初代軟骨細胞は単層で 1.0×10^5 cells/cm²の密度で播種し、10% FBS (Gibco, Gaithersburg, MD) を含むDMEM (Nacalai tesque inc., Kyoto, Japan) で培養した。

6-3-2. 小胞体ストレスの誘導

軟骨細胞の培地を無血清培地の DMEM/Ham's F-12 (Nacalai tesque inc., Kyoto, Japan) に交換し 12 時間培養した後、0.5% FBS を含む DMEM/Ham's F-12 に溶解した TM (Calbiochem, San Diego, CA) 1 µg/ml で 12 時間培養した (TM+群)。TM が添加されていない軟骨細胞を TM-群とした。

6-3-3. RNA の抽出と cDNA 作製

総 RNA は RNeasy Mini kit (Qiagen, Valencia, CA) と DNase (Qiagen) を用いて抽出し、RNA の精製と DNA の除去を行った。精製された RNA は High Capacity RNA-to-cDNA kit (Applied Biosystems, Foster, CA) を用いて逆転写し、cDNA を作製した。

6-3-4. Real-time RT-PCR

Real-time RT-PCR の解析は Applied Biosystems 7500 PCR system (Applied Biosystems) により行った。TaqMan universal PCR Master Mix と TaqMan gene expression assays の *Chop* (Mm001135937_g1)、

Grp78 (Mm00517690_g1)、*Acan* (Mm00545807_m1)、*Col2a1* (Mm00491889_m1)、*Mmp13* (Mm01168713_m1)、および *Gapdh* (Mm99999915_g1) は Applied Biosystems より入手した。Real-time RT-PCR 反応は 50°C、2 分間、続いて 95°C、10 分間の培養後、95°C、15 秒間と 60°C、1 分間を 40 サイクル行った。各遺伝子の発現量は *Gapdh* mRNA を内因性コントロールとして $\Delta\Delta Ct$ 法で定量した。

6-3-5. RT-PCR

Xbp1 mRNA のスプライシングを RT-PCR により評価した。*Xbp1* mRNA に対する PCR 増幅は、TaKaRa LA Taq (Takara, Kyoto, Japan) と Gene Amp PCR system 9700 (Applied Biosystems) を使用した。使用された *Xbp1* プライマーのシーケンスは 5'-GAGCAGCAAGTGGTGGATTT-3' (sense)、5'-AGGGTCCAACCTTGTCAGAA-3' (antisense) である。PCR 反応は、94°C、30 秒間の denaturation、56°C、30 秒間の annealing、72°C、30 秒間の extension を 33 サイクルで行った。このプライマーにより *Xbp1s* と *Xbp1u* mRNA の両方が増幅された。IRE1 α によってスプライスされる 26 塩基の部位が *Xbp1u* mRNA の PCR 産物に含まれるように設計されている。この 26 塩基の部位は PstI 制限酵素の切断部位を含むため、この部位がスプライスされた *Xbp1s* mRNA の PCR 産物では PstI 制限酵素の切断部位が消失している。従って、このプライマーの PCR 産物を PstI 制限酵素で処理 (37°C、2 時間) すると、*Xbp1s* の PCR 産物は 323bp、*Xbp1u* の PCR 産物は 228bp と 116bp となる。全ての PCR 産物を 2% アガロースゲルに電気泳動して可視化した。

6-3-6. Western blotting

軟骨細胞を冷却した PBS で洗浄後、RIPA buffer (50 mM Tris/HCl pH 7.6、150 mM NaCl、1% Nonidet P-40、0.5% sodium deoxycholate、0.1% SDS、protease inhibitor cocktail; Nacalai tesque inc.) で溶解した。タンパク濃度は Lowry protein assay で測定した[35]。2×sample buffer (50 mM Tris/HCl pH 6.8、4% SDS、20% glycerol、0.02% bromophenol blue、5% 2-mercaptoethanol; Nacalai tesque inc.) に溶解された軟骨細胞 (レーンあたり 35 µg) を、95 °C で 5 分間あたためた後、SDS-PAGE により分離し、疎水性 PVDF 製の Immobilon transfer membrane (Millipore, Billerica, MA, USA) に電氣的に転写した。分子マーカーとして Protein Ladder One (Nacalai Tesque Inc.) を使用した。次に、メンブレンを 4% ブロックエース (DS Pharma Biomedical, Osaka, Japan) を用いて室温で 30 分間ブロックした後、Tween-20 を含む TBS により室温で 5 分間、3 回洗浄した。その後、マウス抗 GRP78 monoclonal 抗体 (Santa Cruz Biotechnology) とマウス抗 CHOP monoclonal 抗体 (Santa Cruz Biotechnology) を室温で 1 時間培養した。メンブレンは、Tween-20 を含む TBS で 3 回洗浄した後、horseradish peroxidase-conjugated goat antibody against mouse IgG (Santa Cruz Biotechnology) で 1 時間培養した。タンパクは Chemi-Lumi One Super (Nacalai tesque Inc.) で標識し、luminescent image analyzer (EZ-capture2; ATTO, Tokyo, Japan) を用いて検出した。

6-3-7. TUNEL 染色と caspase-3 の免疫染色

DNA の断片化を TUNEL 染色で、CC3 の発現を免疫染色でそれぞれ評価した。培養軟骨細胞を 4%PFA で 4°C で 60 分間固定した。PBS で洗浄した後、組織学的評価における TUNEL 染色と同様に、*in situ* Cell Death Detection Kit, AP を用いて染色した。CC3 の免疫染色は、一次抗体としてウサギ抗 CC3 monoclonal 抗体を、二次抗体として Alexa Fluor[®]488 を用いて行った。軟骨細胞を PI で対

比染色した後、暗視野にて共焦点レーザー顕微鏡 FLUOVIEW FV300 で観察した。

6-3-8. ELISA

Cell Death Detection ELISA^{Plus} (Roche Diagnostics GmbH) を用いた sandwich ELISA によって、断片化 DNA を検出し定量化した。アポトーシス量は TM-群の吸光度に対する比 (enrichment factor: EF) で評価した。また、同じ刺激実験を施行した軟骨細胞を別の well で培養し、その総蛋白量を Quick StartTM Bradford protein assay (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA) による Bradford 法[36]で定量した。各サンプルのアポトーシス量はこの細胞の総蛋白量で補正し算出した。

6-4. 統計学的解析

全てのデータは平均値 \pm 95% 信頼区間として表した。OA モデルにおける *Chop*^{+/+} マウスと *Chop*^{-/-} マウスとの比較、培養軟骨細胞における *Chop*^{+/+} 細胞と *Chop*^{-/-} 細胞との比較、および TM-群と TM+ 群との比較には Student's *t*-test を用いた。また、0、4、8、および 12 週のスコアには一元配置分散分析 (ANOVA) を用い、各時点間の比較には Bonferroni *post hoc* 検定を行った。有意水準 5% 未満を統計学的に有意とした。全ての統計学的解析には、Stat View version 5.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC) を使用した。

7. 研究結果

7-1. マウス変形性膝関節症モデルにおける解析

7-1-1. 軟骨変性度の評価

Safranin O 染色では、大腿骨内側顆 (MFC) と脛骨内側顆 (MTP) の関節軟骨における基質の変性を評価した。Chop^{+/+}マウスでは4週では関節軟骨表面の不整、線維化を認め、8週では垂直、水平方向への亀裂を生じており軟骨基質が菲薄化していた。12週では関節軟骨の菲薄化がさらに進行しており、軟骨下骨が一部露出していた (図4A)。Chop^{-/-}マウスでも週齢が増すにつれて軟骨変性の進行を認めたが、Chop^{+/+}マウスと比較して軟骨基質の構造は保たれ、染色性の低下は緩徐であった。0、4、8、および12週の modified Mankin score は、MFC では Chop^{+/+}マウスで0.3、18.1、25.0、および32.5、Chop^{-/-}マウスで0.2、8.4、13.1、および21.4であり、両群とも週数が増すにつれて増加し、両群ともに各時点間で有意差を認めた (図4B)。MTP では Chop^{+/+}マウスでそれぞれ0.4、17.2、24.9、および35.9、Chop^{-/-}マウスでそれぞれ0.3、9.2、14.5、および24.3であり、MFCと同様に両群とも週数が増すにつれて増加し、各時点間で有意差を認めた (図4C)。Chop^{+/+}マウスと Chop^{-/-}マウスを比較すると、MFC、MTPともに4、8、および12週で Chop^{-/-}マウスの方が Chop^{+/+}マウスより有意に低かった。

7-1-2. アポトーシスの評価

軟骨細胞のアポトーシスを TUNEL 染色と CC3 の免疫染色で評価した。TUNEL 陽性細胞数は Chop^{+/+}マウスでは週数が増すにつれて徐々に増加した (図5A)。Chop^{-/-}マウスでも同様に増加したが、Chop^{+/+}マウスと比較して陽性細胞数が少なかった。0、4、8、および12週の TUNEL 陽性細胞

率は、*Chop*^{+/+}マウスでそれぞれ 1.1%、23.1%、36.5%、および 45.4%、*Chop*^{-/-}マウスでそれぞれ 1.3%、13.1%、26.5%、および 33.2% であり、両群とも週数が増すにつれて増加し、各時点間で有意差を認めた (図 5B)。両群を比較すると、4、8、および 12 週で *Chop*^{-/-}マウスの方が *Chop*^{+/+}マウスより有意に低値を呈した。CC3 の免疫染色では、TUNEL 染色と同様に、CC3 陽性細胞は *Chop*^{+/+}、*Chop*^{-/-}マウスともに週数が増すにつれて徐々に増加したが、*Chop*^{+/+}マウスより *Chop*^{-/-}マウスの方が陽性細胞数は少なかった (図 5C)。0、4、8、および 12 週の CC3 陽性細胞率は、*Chop*^{+/+}マウスでそれぞれ 0.3%、21.9%、35.1%、および 45.8%、*Chop*^{-/-}マウスでそれぞれ 0.3%、12.0%、21.3%、および 33.1% であり、両群とも週数が増すにつれて増加し、各時点間で有意差を認めた (図 5D)。両群を比較すると、4、8、および 12 週で *Chop*^{-/-}マウスの方が *Chop*^{+/+}マウスより有意に低値を呈した。

7-1-3. 小胞体ストレスの評価

小胞体ストレスを CHOP、GRP78、および XBP1s の免疫染色で評価した。CHOP に対する陽性細胞は、*Chop*^{+/+}マウスでは週数が増すにつれて徐々に増加した (図 6A)。一方、*Chop*^{-/-}マウスでは陽性細胞を認めなかった。*Chop*^{+/+}マウスの陽性細胞率は 0 週で 3.1%、4 週で 12.8%、8 週で 15.9%、12 週で 27.9% であり、週数が増すにつれて増加しており、各時点間で有意差を認めた (図 6B)。両群を比較すると、いずれも *Chop*^{-/-}マウスの方が *Chop*^{+/+}マウスより有意に低かった。

GRP78 に対する陽性細胞は、*Chop*^{+/+}、*Chop*^{-/-}マウスともに 0 週と比較して 4、8、および 12 週で多く認めた (図 6C)。0、4、8、および 12 週での陽性細胞率は、*Chop*^{+/+}マウスで 24.7%、42.8%、44.2%、41.0%、*Chop*^{-/-}マウスでそれぞれ 26.8%、45.0%、46.9%、および 43.1% であり、0 週と比較して 4、8、および 12 週で有意に高かったが、4、8、12 週間に差は認めなかった (図 6D)。また、

Chop^{+/+}と *Chop*^{-/-}マウスを比較すると、いずれの時点でも両群間に有意差はなかった。

XBPIs に対する陽性細胞は、GRP78 と同様に *Chop*^{+/+}、*Chop*^{-/-}マウスともに 0 週と比較して 4、8、および 12 週で多く認めた (図 6E)。0、4、8、および 12 週での陽性細胞率は、*Chop*^{+/+}マウスでそれぞれ 16.3%、38.8%、33.2%、および 31.2%、*Chop*^{-/-}マウスでそれぞれ 14.3%、35.0%、34.9%、および 32.5%であり、0 週と比較して 4、8、および 12 週で有意に高かったが、4、8、12 週間に差は認めなかった (図 6F)。また、*Chop*^{+/+}と *Chop*^{-/-}マウスを比較すると、いずれの時点でも両群間に有意差はなかった。

7-1-4. 軟骨代謝機能の評価

軟骨細胞の同化作用と異化作用をそれぞれ COL2 と MMP13 の免疫染色で解析した。COL2 の染色性は週数が増すにつれて *Chop*^{+/+}、*Chop*^{-/-}マウスとも徐々に低下したが、*Chop*^{-/-}マウスの方が *Chop*^{+/+}マウスより染色性が保たれていた (図 7A)。0、4、8、および 12 週での H-score は、*Chop*^{+/+}マウスでそれぞれ 249.0、187.6、151.2、および 116.2、*Chop*^{-/-}マウスでそれぞれ 256.5、225.2、195.2、および 163.6 であり、両群とも週数が増すにつれて低下し、各時点間で有意差を認めた (図 7B)。また、両群を比較すると、4、8、および 12 週で *Chop*^{-/-}マウスの方が *Chop*^{+/+}マウスより有意に高値を呈した。

MMP13 の陽性細胞は、週数が増すにつれて *Chop*^{+/+}、*Chop*^{-/-}マウスとも徐々に増加したが、*Chop*^{-/-}マウスの方が *Chop*^{+/+}マウスより陽性細胞数が少なかった (図 7C)。0、4、8、および 12 週の MMP13 陽性細胞率は、*Chop*^{+/+}マウスでそれぞれ 18.8%、27.5%、33.4%、および 41.3%、*Chop*^{-/-}マウスで 15.3%、20.1%、27.4%、および 33.4%であり、両群とも週数が増すにつれて増加し、各時点間で有意差を認

めた (図 7D)。また、両群を比較すると、4、8、および 12 週で *Chop*^{-/-} マウスの方が *Chop*^{+/+} マウスより有意に低かった。

7-2. マウス培養軟骨細胞における評価

7-2-1. 小胞体ストレスの評価

Chop^{+/+} 軟骨細胞の *Chop* mRNA 発現は、TM+群で TM-群の 20.5 倍に増加し (図 8A)、タンパク量も増加した (図 7B)。*Chop*^{-/-} 軟骨細胞では、CHOP の mRNA とタンパクの発現を認めず、CHOP の発現がノックアウトされていることを確認した。*Grp78* mRNA 発現は、TM 投与により *Chop*^{+/+} 細胞では 13.5 倍、*Chop*^{-/-} 細胞では 12.6 倍とそれぞれ有意に増加し、両細胞間に有意差は認めなかった (図 7C)。GRP78 のタンパク発現も、TM+群で両細胞がほぼ同等に増加した (図 8D)。*Xbp1s* mRNA の発現は、両細胞の TM+群で増加し、両細胞間に差は見られなかった (図 8E)。

7-2-2. アポトーシスの評価

TUNEL 染色によるアポトーシスの評価では、TM+群で *Chop*^{+/+}、*Chop*^{-/-} 細胞ともに TUNEL 陽性細胞が増加したが、*Chop*^{-/-} 細胞は *Chop*^{+/+} 細胞と比較して TUNEL 陽性細胞が少なかった (図 9A)。CC3 の免疫染色でも同様に、TM+群で *Chop*^{+/+}、*Chop*^{-/-} 細胞ともに陽性細胞が増加したが、*Chop*^{-/-} 細胞は *Chop*^{+/+} 細胞と比較して陽性細胞が少なかった (図 9B)。ELISA では、TM+群のアポトーシスは、TM-群より *Chop*^{+/+} 細胞で 4.4 倍、*Chop*^{-/-} 細胞で 2.0 倍増加し、*Chop*^{-/-} 細胞では *Chop*^{+/+} 細胞より有意に低かった (図 9C)。

7-2-3. 軟骨細胞の代謝機能の評価

軟骨細胞の同化作用を *Acan* と *Col2a1* mRNA の発現で評価した。*Acan* mRNA 発現は、TM 投与によって *Chop*^{+/+} 細胞で 39.6% に、*Chop*^{-/-} 細胞で 62.9% に低下し、両細胞を比較すると *Chop*^{-/-} 細胞の方が *Chop*^{+/+} 細胞より発現量が有意に高かった (図 10A)。*Col2a1* mRNA 発現は、TM 投与によって *Chop*^{+/+} 細胞で 28.8% に、*Chop*^{-/-} 細胞で 50.0% に低下し、両細胞を比較すると *Chop*^{-/-} 細胞の方が *Chop*^{+/+} 細胞より発現量が有意に高かった (図 10B)。また、軟骨細胞の異化作用を *Mmp13* mRNA の発現で評価した。*Mmp13* mRNA 発現は、TM 投与により *Chop*^{+/+} 細胞で 156.1% に、*Chop*^{-/-} 細胞で 135.1% に増加し、両細胞の発現量を比較すると *Chop*^{-/-} 細胞は *Chop*^{+/+} 細胞より有意に低かった (図 10C)。

8. 考察

本研究では、マウス OA モデルと培養軟骨細胞を用いて、小胞体ストレス、アポトーシス、および軟骨変性について *in vivo* と *in vitro* で解析を行った。*in vivo* の実験において、*Chop*^{+/+} マウスでは軟骨変性の進行に一致して CHOP を含む小胞体ストレスマーカーの発現とアポトーシスが増加した。*Chop*^{-/-} マウスでは *Chop*^{+/+} マウスと同等に小胞体ストレスが惹起されたが、アポトーシスと軟骨変性度は有意に抑制された。*in vitro* の実験において、TM 刺激によって、*Chop*^{-/-} 軟骨細胞では *Chop*^{+/+} 軟骨細胞と同レベルの小胞体ストレスが誘導された。しかし、アポトーシスの増加、*Acan* と *Col2a1* mRNA 発現低下、および *Mmp13* mRNA の発現増加は *Chop*^{-/-} 軟骨細胞で有意に抑制された。

CHOP はアポトーシス関連分子であり、軟骨細胞では小胞体ストレス誘導剤で CHOP 発現とアポトーシスが增加することが報告されている[29, 37, 38]。また、ヒト OA 軟骨では CHOP の発現とアポトーシスは軟骨変性度と相関して増加することから[29]、CHOP によって誘導される小胞体ストレス性アポトーシスが軟骨変性に強く関与することが示唆されるが、動物 OA モデルでは CHOP の発現増加がアポトーシスと軟骨変性に及ぼす影響について検証されていない。そこで我々は *Chop*^{+/+} マウスと *Chop*^{-/-} マウスの外科的 OA モデルを用いて、両群における小胞体ストレス、アポトーシスおよび軟骨変性度を比較検討した。その結果、*Chop*^{+/+} マウスでは CHOP 発現とアポトーシスが軟骨変性の進行とともに増加したが、*Chop*^{-/-} マウスではアポトーシスと軟骨変性が抑制されたことから、CHOP を介した軟骨細胞アポトーシスが軟骨変性の進行に寄与することが示された。

CHOP は Bcl-2 の抗アポトーシス効果を抑制し、Bim や Bax といった pro-apoptotic な因子を活性化することで、最終的にカスパーゼ経路を活性化しアポトーシスを誘導する[39-41]。マウス皮質ニ

ユーロン [42] やヒト肺癌細胞 [43] において、CHOP の caspase-3 活性化がアポトーシスを誘導することが報告されている。本研究において、*Chop*^{+/+} マウスで軟骨変性とともに増加した CC3 の発現が、*Chop*^{-/-} マウスでは抑制されていたことから、軟骨細胞でも CHOP は caspase-3 を介してアポトーシスを誘導することが示唆された。

マウス OA モデルでは、*Chop*^{+/+} マウスにおいて軟骨変性の進行とともにアポトーシスが増加し、Safranin-O によって染色されるグルコサミノグリカンを含む ACAN [44, 45] と COL2 の発現が減少し、MMP13 の発現が増加した。これらの変化は *Chop*^{-/-} マウスでも認められたが、*Chop*^{+/+} マウスと比較すると変化量は有意に小さかった。メカニカルストレスによる軟骨基質発現の抑制は、アポトーシス抑制によって回復されることは報告されている[13, 16, 46]。本研究の OA モデルの結果から、小胞体ストレス性アポトーシスの抑制でも同様に基質発現の低下が回復することが示された。また、小胞体ストレスを誘導するために培養軟骨細胞に TM を投与すると、*Chop*^{+/+} 細胞では小胞体ストレス性アポトーシスが増加し、*Acan* と *Col2a1* の mRNA 発現が低下、*Mmp13* mRNA の発現が増加した。これらの変化は *Chop*^{-/-} 細胞でも認められたが、*Chop*^{+/+} 細胞と比較すると変化量は有意に小さかった。以上から、小胞体ストレス下で CHOP が軟骨細胞アポトーシスを誘導し、軟骨細胞の代謝機能に影響を与えることが明らかとなり、*Chop* 遺伝子の発現抑制により OA の重症度を軽減することの遺伝学的確証を得た。

本研究において、小胞体ストレスの発生は *in vivo*、*in vitro* の実験ともに *Chop* 遺伝子欠損の有無に関わらず明らかな差は認めなかった。小胞体内に異常蛋白が蓄積すると、ストレスセンサータンパク IRE1 α 活性化によって XBP1 のスプライシングが惹起され、分子シャペロンや ERAD 関連因子の遺伝子が誘導される[21, 47, 48]。分子シャペロンである GRP78 はタンパクの折りたたみを促進

する[49]。これらの UPR は細胞の恒常性を担うが、小胞体ストレスが過剰になると CHOP の発現が上昇し、UPR システムが恒常性の維持よりアポトーシスの促進が優勢になる[50]。Chop^{-/-}マウスおよび Chop^{-/-}細胞において GRP78、XBP1s の発現が Chop^{+/+}マウスおよび Chop^{+/+}細胞と同等だった結果は、Chop 遺伝子の有無で小胞体ストレスの発生に差はなく、Chop^{+/+}軟骨細胞と Chop^{-/-}軟骨細胞は恒常性維持機能を同等に有していたことを意味する。

ヒト OA 軟骨において、CHOP の発現は変性度が高くなるにつれて増加するが、XBP1s の発現は中等度の変性では増加するものの、高度の変性では中等度より低下することから、高度変性軟骨では UPR は恒常性維持よりもアポトーシス促進が優勢であることが報告されている[29]。本研究の *in vivo* の実験で、Chop^{+/+}マウスにおける GRP78、XBP1s および CHOP の発現は 4 週で増加し、8 週では GRP78、XBP1s の発現は 4 週と同程度だったのに対して CHOP の発現は増加した。この結果は、4 週から 8 週の間 UPR システムが恒常性維持よりアポトーシス促進が優勢になったことを示唆し、8 週時点でのアポトーシスがさらに増加した結果に一致する。つまり、動物 OA モデルでも同様に、軟骨変性が進行するにつれて UPR が恒常性の維持からアポトーシス促進の方向に移行することが確認された。*in vitro* の実験において Chop^{-/-}細胞でアポトーシスが抑制され、軟骨細胞機能低下が抑制されたことも考慮すると、UPR システムにおける CHOP の発現上昇によるアポトーシスの促進が、軟骨変性進行の一因であると考えられた。

本研究では、軟骨変性における CHOP を介した小胞体ストレス性アポトーシスに注目して研究を進めた。OA 初期では、アグリカンの喪失が軟骨細胞のアポトーシスに先行するとされる[51]。我々が使用した OA モデルの術後 8、12 週時点は、ヒトでは初期～中等度の OA に対応するとされており[32, 52, 53]、アポトーシスが出現する術後 4 週を解析開始時期とした。術後 4 週より早期では

Chop^{+/+} と *Chop*^{-/-} マウスにおけるアポトーシスの発生に差はないと思われるが、両群との間にアグリカンの喪失に有意差があれば、CHOP がアポトーシスに関連しない経路で軟骨変性に影響する可能性があると考えられる。現在まで CHOP が軟骨の代謝を直接的に調節するというエビデンスは得られていない。Hayashida ら[54]は、ヒトにおいて C/EBP β が MMP13 の promoter region に直接結合することを報告した。CHOP は C/EBP β と同様に C/EBP family に属するが、他の family member に対し dominant negative 効果によって抑制的に働く[55]。本研究において、*Mmp13* mRNA の発現は *Chop*^{-/-} 細胞の TM-群で抑制されており、CHOP が MMP13 の発現に関与している可能性がある。今後は、*Chop*^{-/-} マウスを用いた研究によって、CHOP の機能として軟骨変性におけるアポトーシス促進作用以外の影響について詳細な検討を行う必要があると考えている。

本研究にはいくつかの限界が存在する。外科的に関節不安定性を誘導する一般的な動物 OA モデルはヒト OA の経過よりも進行が早いため、加齢により緩徐に進行するヒトの特発性 OA とは全く同じ病態とは言えない。しかし、この OA モデルは広く使用されている一般的な動物モデルであり[53, 56, 57]、ヒト OA の病理学的な特徴と類似しているとされており[32]、モデルの再現性は得られていると判断した。また、本研究では CHOP 以外の小胞体ストレス性アポトーシス経路を解析していない。*in vitro* では *Chop*^{-/-} 細胞で小胞体ストレス性アポトーシスは完全には抑制されていなかった。小胞体ストレスを介したアポトーシスは、JNK によっても誘導される[50]。また、酸化ストレスと小胞体ストレスの crosstalk も報告されており[58]、CHOP 以外のアポトーシス関連分子と小胞体ストレス性アポトーシスとの関連について、その詳細は不明である。また、*in vivo* において、小胞体ストレスが軟骨細胞アポトーシスを惹起したことの直接的な証拠を示していない。今後、CHOP 以外の因子と小胞体ストレスの関連性について我々の OA モデルを用いて解析する必要がある。

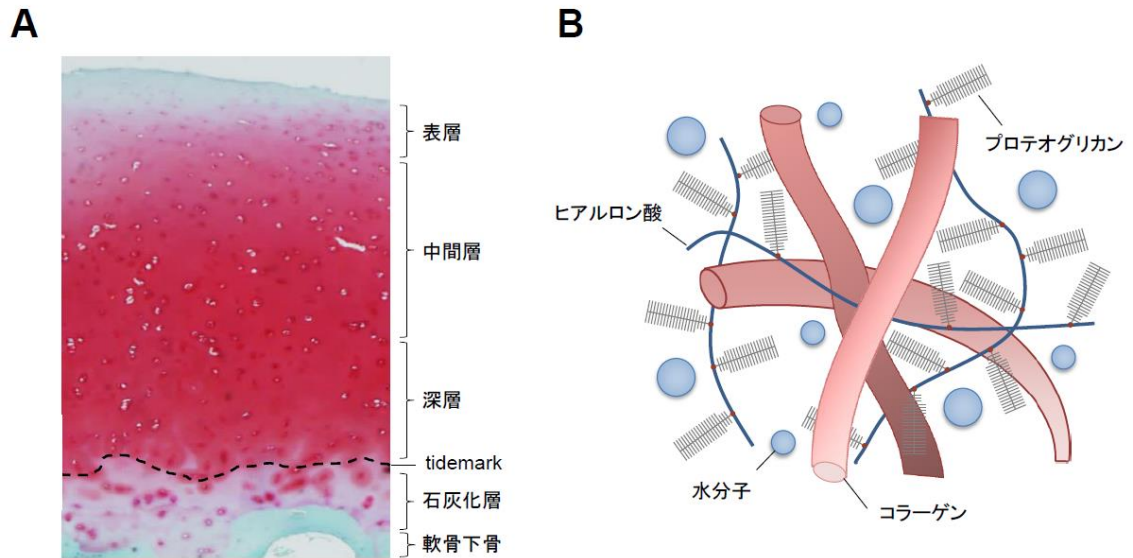
現在、OA 病態の分子メカニズムの解明に向けて、様々な基礎研究がなされている。本研究の結果から、CHOP を中心とした小胞体ストレス性アポトーシスの経路をターゲットにした薬剤の開発は、OA の進行を改善できる治療薬 (DMOAD) として次世代の治療法に結び付くと考えられる。

9. 結語

CHOP を介した軟骨細胞アポトーシスが軟骨変性の進行に寄与し、CHOP が OA の発症と病態に重要な役割を有する。

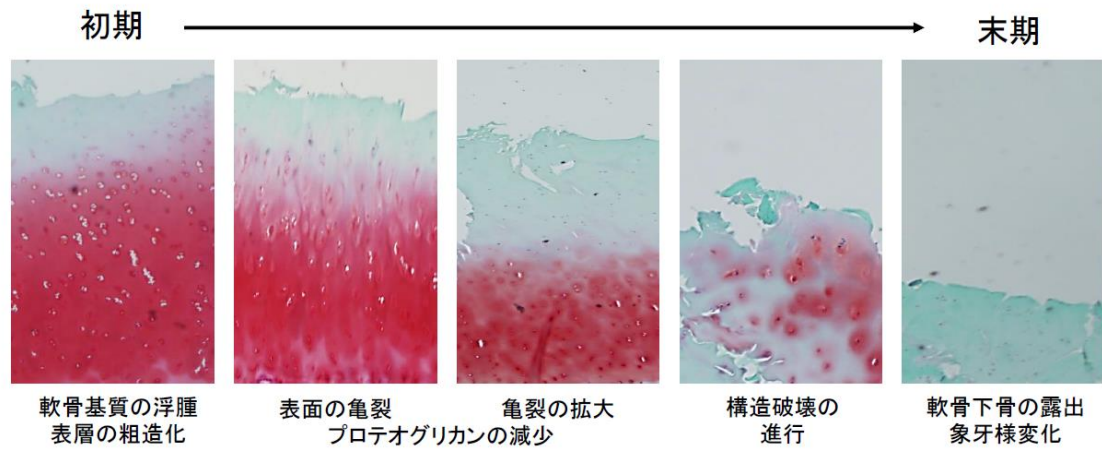
10. 図表

図1. 関節軟骨の構造



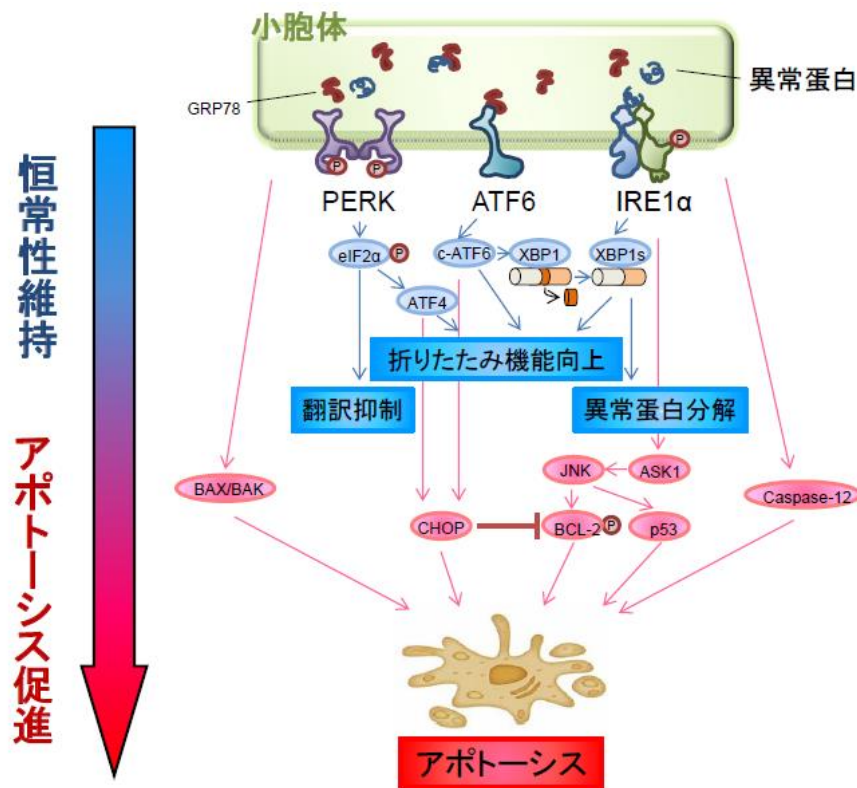
関節軟骨は関節の表面を覆う硝子軟骨である。A.関節軟骨は関節表面から表層、中間層、深層、石灰化層で構成され、深層と石灰化層の間には tidemark がみられる。B. コラーゲン線維はらせん構造を呈し、その間にヒアルロン酸に結合したプロテオグリカンが凝集体として存在し、水分子を保持している。

図 2. OA 軟骨の病理学的変化



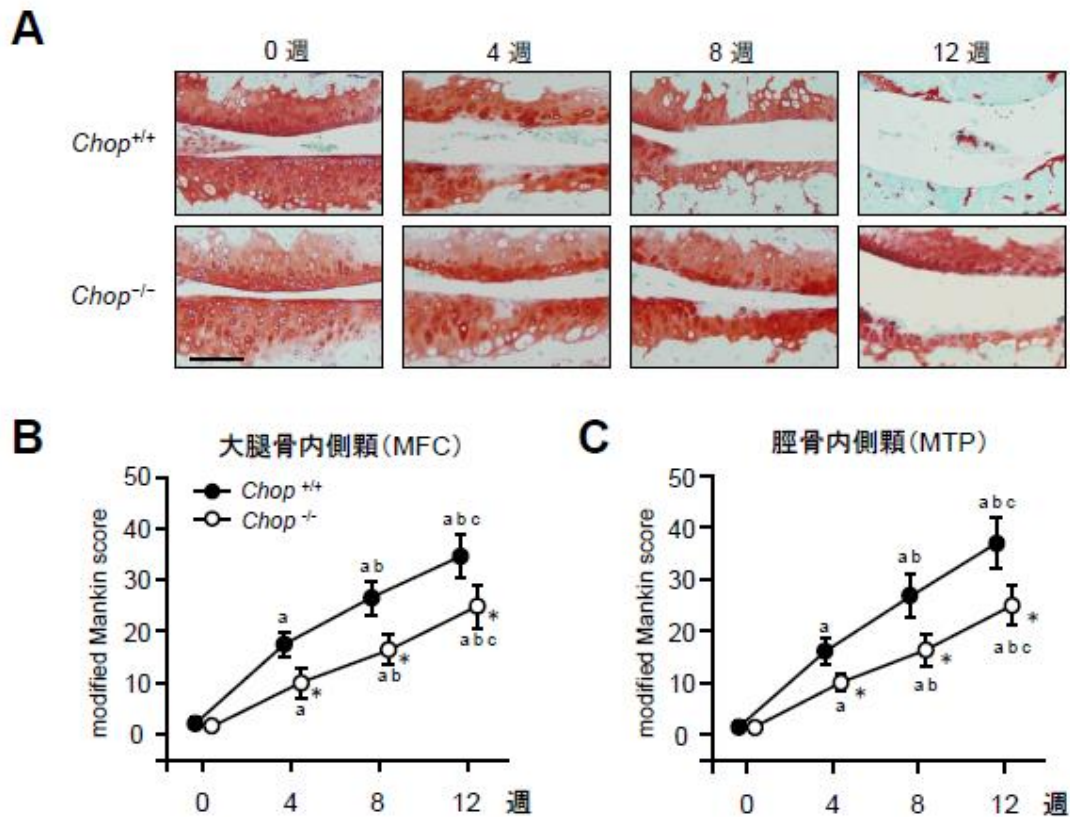
OA の初期では、関節軟骨に基質の浮腫と表面の粗造化を認め、進行すると表面に亀裂が生じるとともに周囲のプロテオグリカンは減少する。亀裂が拡大するとプロテオグリカンはさらに減少し、徐々に基質の菲薄化が進行する。構造破壊が進むにつれて菲薄化はさらに顕著となり、最終的には関節軟骨が消失して関節腔に軟骨下骨が露出する。表面は関節運動により研磨され象牙様変化を呈する。

図 3. 小胞体ストレス応答 (UPR)



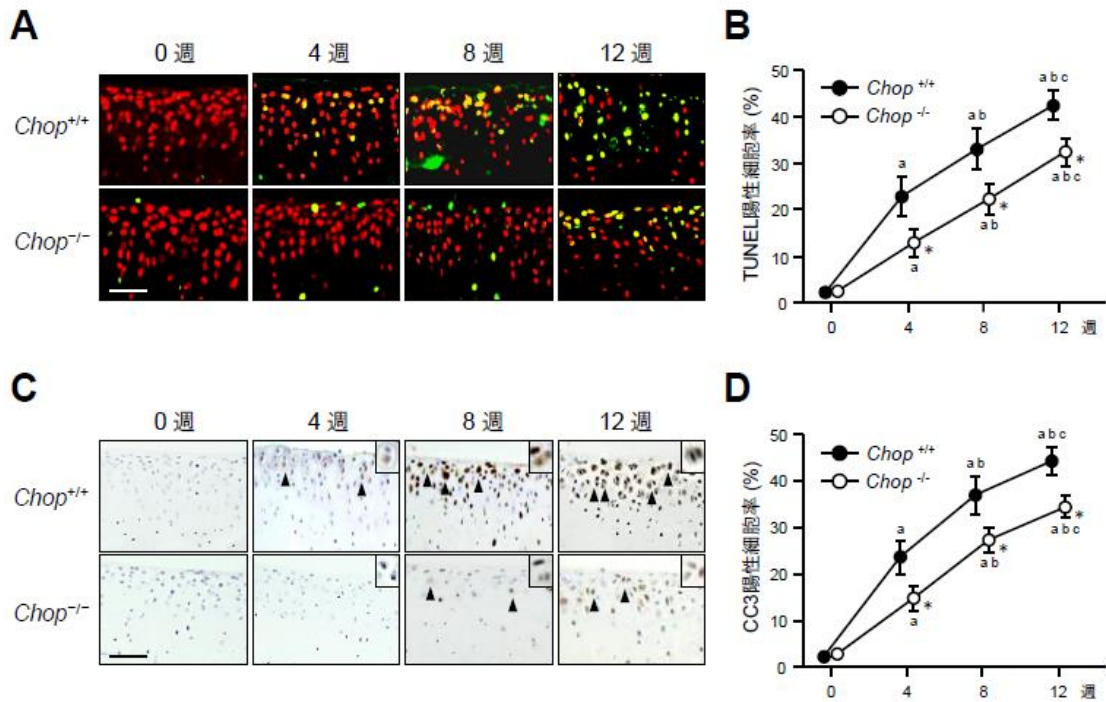
UPR の機序を示す。構造異常蛋白の蓄積により小胞体ストレスが惹起されると、センサー蛋白 (PERK、IRE1 α 、ATF6) が活性化され、小胞体ストレス応答 (UPR) が誘導される。PERK は自己リン酸化し、eIF2 α のリン酸化を促進することで新生蛋白の翻訳を抑制する。IRE1 α はリン酸化された後、XBP1 mRNA のスプライシングを誘導し、GRP78 の発現を促進することで蛋白の折りたたみ機能を向上させる。また、XBP1 蛋白は ERAD 関連分子の発現を増加させることにより、異常蛋白の分解除去を促進する。ATF6 は小胞体シャペロンを誘導する。細胞はこれらの UPR により蛋白質の恒常性を維持する。しかし、小胞体ストレスと UPR のバランスが崩れると CHOP や JNK の発現が増加し、細胞はアポトーシスへ陥る。

図4. マウス OA モデルにおける軟骨変性の経過



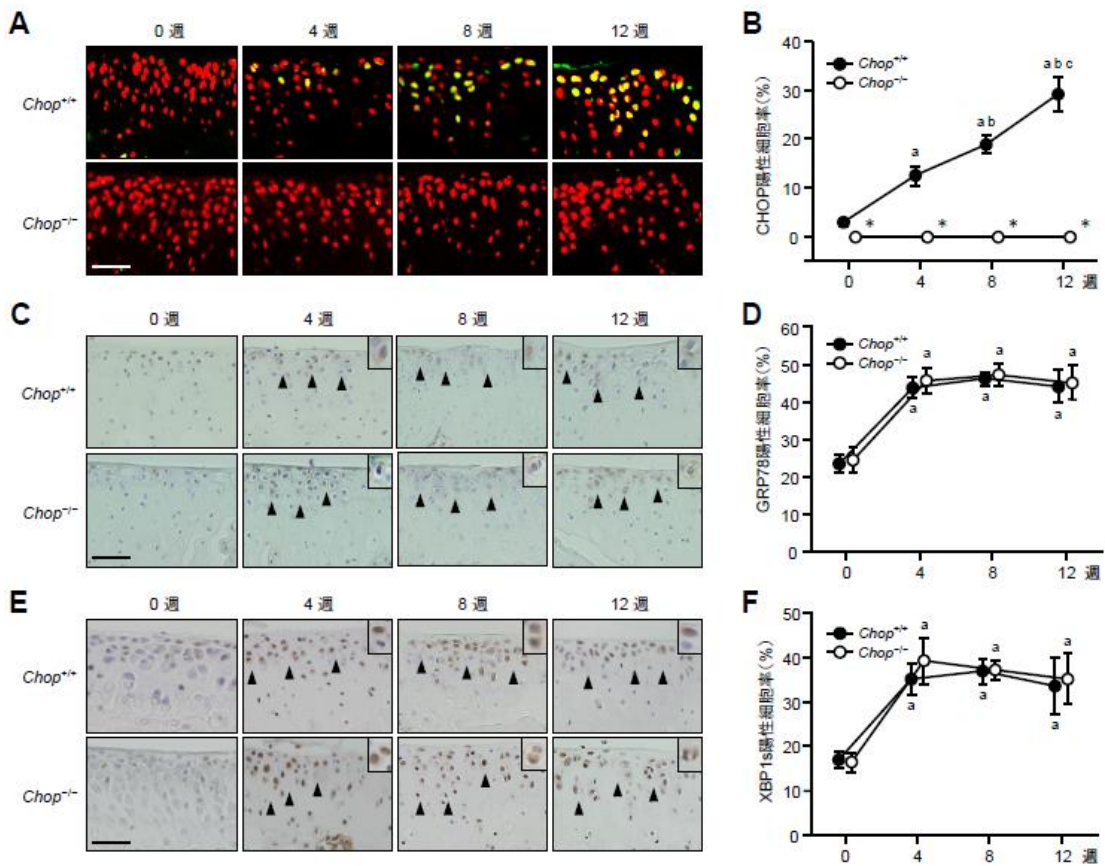
大腿骨内顆 (MFC) と脛骨内顆 (MTP) の関節軟骨における軟骨変性をSafranin-O染色によって評価した。また、軟骨変性度はmodified Mankin scoreによって評価した。A. 0週から12週にかけて、*Chop*^{+/+}と*Chop*^{-/-}マウスともにSafranin-Oの染色性は低下したが、*Chop*^{-/-}マウスの方が*Chop*^{+/+}マウスより染色性は保たれていた。B. MFCにおけるmodified Mankin scoreは各時点間で有意差を認め、4、8、および12週では*Chop*^{-/-}マウスの方が*Chop*^{+/+}マウスよりも有意に低値であった。C. MTPにおけるmodified Mankin scoreもMFCと同様に各時点間で有意差を認め、4、8、および12週では*Chop*^{-/-}マウスの方が*Chop*^{+/+}マウスよりも有意に低かった。Scale bar = 100 μm、a = $p < 0.05$ 対 0週、b = $p < 0.05$ 対 4週、c = $p < 0.05$ 対 8週 (一元配置分散分析、Bonferroni post hoc検定)、* $p < 0.05$ 対 *Chop*^{+/+}マウス (Student's t-test)

図5. マウス OA モデルにおけるアポトーシスの経過



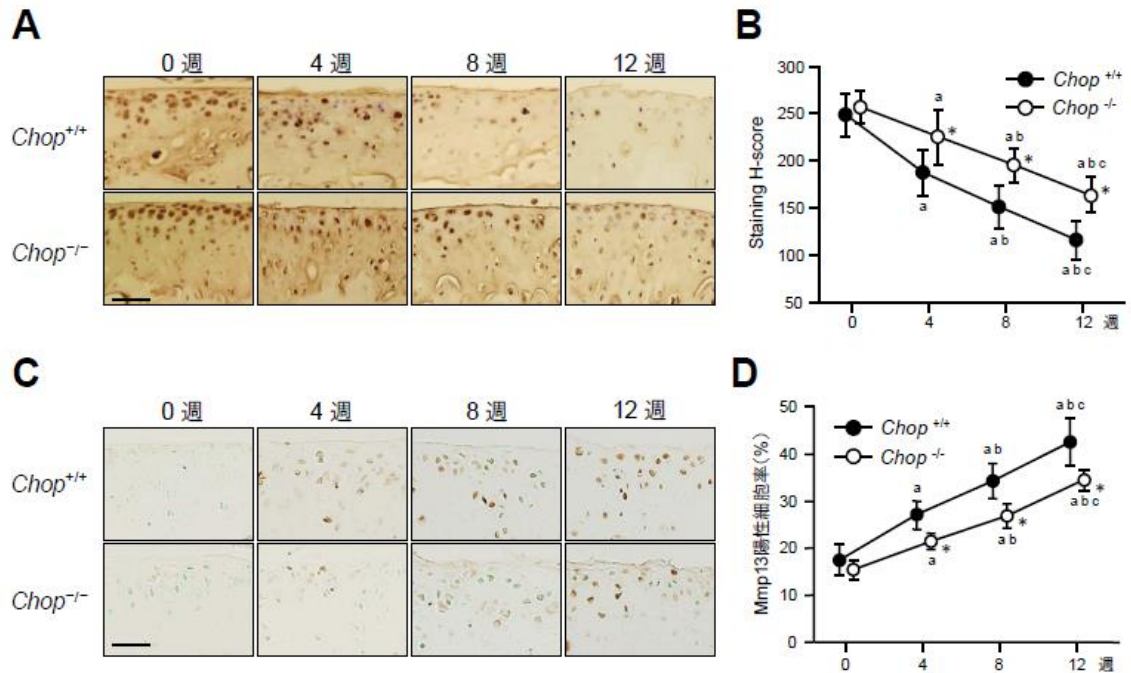
DNAの断片化とCC3の発現をTUNEL染色とCC3の免疫染色により評価し、それぞれの陽性細胞率でアポトーシスの解析を行った。A. 軟骨内のTUNEL陽性細胞は、*Chop*^{+/+}と*Chop*^{-/-}マウスともに週数が増すにつれて徐々に増加し、*Chop*^{-/-}マウスでは*Chop*^{+/+}マウスと比較して陽性細胞は少なかった。B. TUNEL陽性細胞率は各時点間で有意差を認め、4、8、および12週では*Chop*^{-/-}マウスの方が*Chop*^{+/+}マウスよりも有意に低かった。C. CC3の陽性細胞は、*Chop*^{+/+}と*Chop*^{-/-}マウスともに週数が増すにつれて徐々に増加し、*Chop*^{-/-}マウスでは*Chop*^{+/+}マウスよりも陽性細胞が少なかった。D. CC3陽性細胞率は各時点間で有意差を認め、4、8、および12週で*Chop*^{-/-}マウスの方が*Chop*^{+/+}マウスよりも有意に低かった。Scale bar = 100 μ m、矢印は陽性細胞を示す。a = $p < 0.05$ 対 0週、b = $p < 0.05$ 対 4週、c = $p < 0.05$ 対 8週（一元配置分散分析、Bonferroni post hoc検定）、* $p < 0.05$ 対 *Chop*^{+/+}マウス（Student's t-test）

図 6. マウス OA モデルにおける小胞体ストレスの経過



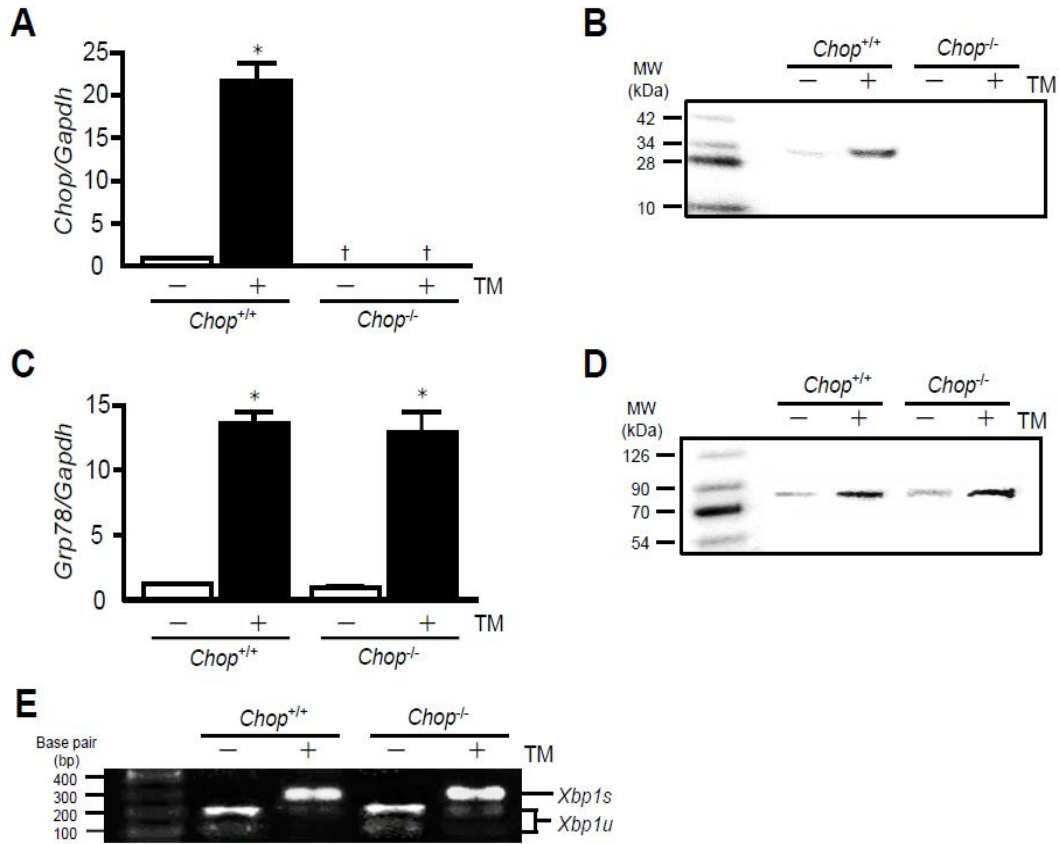
関節軟骨におけるCHOP、GRP78、およびXBP1sの発現は免疫染色により評価し、各染色の陽性細胞率により半定量的に解析した。A. CHOP陽性細胞は、*Chop*^{+/+} マウスでは週数の増加とともに徐々に増加したが、*Chop*^{-/-} マウスではすべての時点で発現を認めなかった。B. CHOP陽性細胞率は、*Chop*^{+/+} マウスでは週数の増加とともに増加し、すべての時点で*Chop*^{-/-} マウスより有意に高かった。C. GRP78に対する陽性細胞は、*Chop*^{+/+}、*Chop*^{-/-} マウスともに0週より4、8、12週で多かった。D. GRP78陽性細胞率は、*Chop*^{+/+} と*Chop*^{-/-} マウスともに0週より4、8、12週で有意に高く、いずれの時点でも両群間に有意差は認めなかった。E. XBP1sに対する陽性細胞は、*Chop*^{+/+} と*Chop*^{-/-} マウスともに0週より4、8、12週で多く認めた。F. XBP1s陽性細胞率は、*Chop*^{+/+} と*Chop*^{-/-} マウスともに0週より4、8、12週で有意に高く、いずれの時点でも両群間に有意差は認めなかった。Scale bar = 100 μ m、矢印は陽性細胞を示す。a = $p < 0.05$ 対 0週（一元配置分散分析、Bonferroni post hoc検定）、* $p < 0.05$ 対 *Chop*^{+/+} マウス（Student's t-test）

図7. マウス OA モデルにおける軟骨代謝の経過



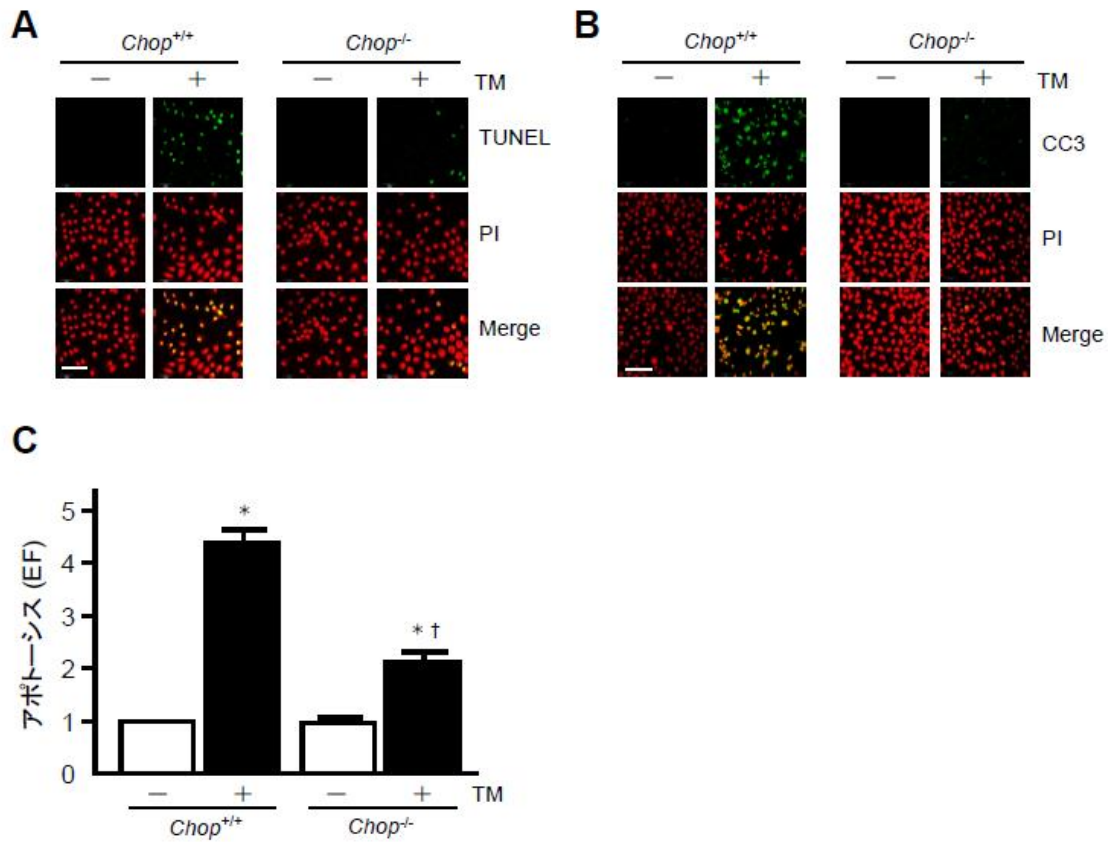
COL2とMMP13の発現は免疫染色により評価した。COL2の発現はH-scoreで、MMP13の発現は陽性細胞率でそれぞれ半定量的に解析した。A. COL2の染色性は*Chop*^{+/+}と*Chop*^{-/-}マウスともに週数の増加とともに徐々に低下し、*Chop*^{-/-}マウスの方が*Chop*^{+/+}マウスと比較して染色性は保たれていた。B. H-scoreは*Chop*^{+/+}と*Chop*^{-/-}マウスともに各時点間で有意差を認め、4、8、および12週では*Chop*^{-/-}マウスの方が*Chop*^{+/+}マウスよりも有意に高かった。C. MMP13の陽性細胞は、*Chop*^{+/+}と*Chop*^{-/-}マウスともに週数の増加とともに徐々に増加し、*Chop*^{-/-}マウスの方が*Chop*^{+/+}マウスより陽性細胞が少なかった。D. MMP13の陽性細胞率は、*Chop*^{+/+}と*Chop*^{-/-}マウスともに各時点間で有意差を認め、4、8、および12週では*Chop*^{-/-}マウスの方が*Chop*^{+/+}マウスよりも有意に低かった。Scale bar = 100 μ m、矢印は陽性細胞を示す。a = $p < 0.05$ 対 0週、b = $p < 0.05$ 対 4週、c = $p < 0.05$ 対 8週（一元配置分散分析、Bonferroni post hoc検定）、* $p < 0.05$ 対 *Chop*^{+/+}マウス（Student's t-test）

図8. 培養軟骨細胞における小胞体ストレスの評価



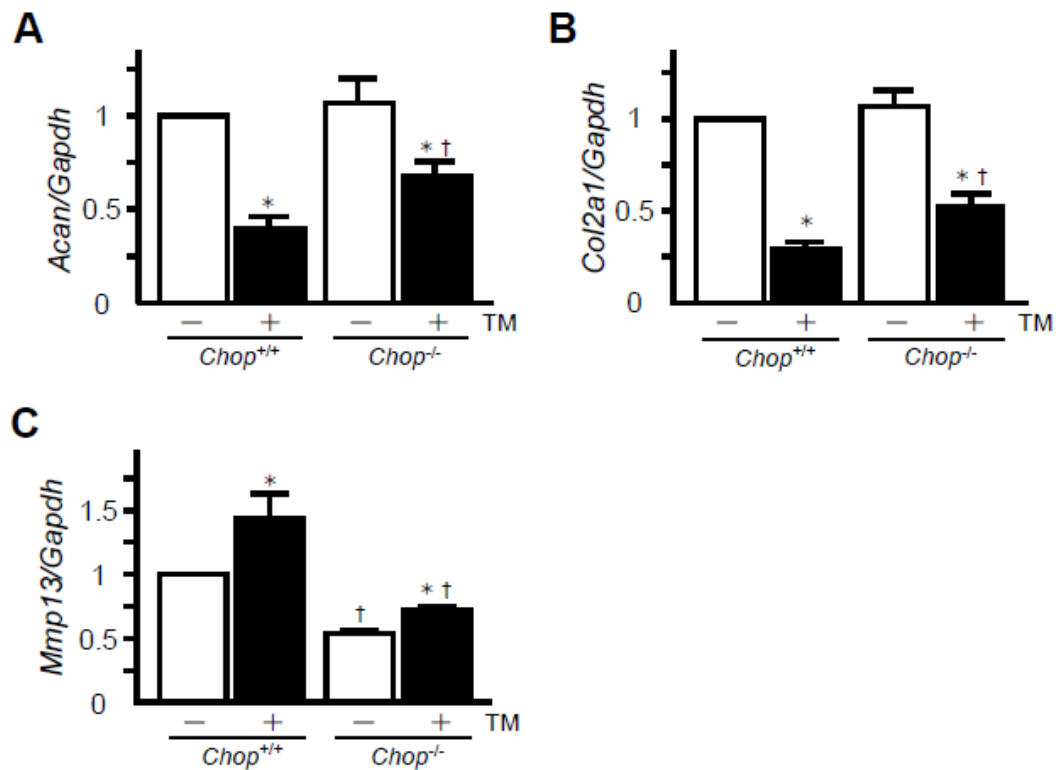
小胞体ストレスはCHOP、GRP78、およびXBP1sの発現により評価した。A. *Chop* mRNAの発現は、TM投与により *Chop*^{+/+} と *Chop*^{-/-} の軟骨細胞でともに増加したが、*Chop*^{+/+} 細胞より *Chop*^{-/-} 細胞の方が低かった。B. CHOPのタンパク発現量は、*Chop*^{+/+} 細胞ではTM投与により増加したが、*Chop*^{-/-} 細胞ではTM投与の有無に関わらず、発現を認めなかった。C. *Grp78* mRNA発現はTM投与により *Chop*^{+/+}、*Chop*^{-/-} 細胞ともに増加し、両群間に有意差は認めなかった。D. GRP78のタンパク発現量はTM投与によって *Chop*^{+/+}、*Chop*^{-/-} 細胞ともに同等に増加していた。E. *Xbp1s* mRNAの発現は *Chop*^{+/+}、*Chop*^{-/-} 細胞ともに増加した。* $p < 0.05$ 対 TM-、† $p < 0.05$ 対 *Chop*^{+/+} 軟骨細胞 (Student's *t*-test)

図9. 培養軟骨細胞におけるアポトーシスの評価



培養軟骨細胞におけるアポトーシスは、DNAの断片化とCC3の発現により評価した。A. TUNEL染色では、TM投与により*Chop*^{+/+}、*Chop*^{-/-}細胞ともにTUNEL陽性細胞が増加したが、*Chop*^{-/-}細胞は*Chop*^{+/+}細胞と比較して陽性数が少なかった。B. CC3の免疫染色では、TM投与により*Chop*^{+/+}、*Chop*^{-/-}細胞ともに陽性細胞が増加したが、*Chop*^{-/-}細胞は*Chop*^{+/+}細胞と比較して陽性数が少なかった。C. ELISAでは、アポトーシスのレベルはTM投与により*Chop*^{+/+}、*Chop*^{-/-}細胞ともに増加し、*Chop*^{+/+}細胞と比較して*Chop*^{-/-}細胞では有意に低かった。* $p < 0.05$ 対 TM-、† $p < 0.05$ 対 *Chop*^{+/+}軟骨細胞 (Student's *t*-test)

図 10. 培養軟骨細胞における軟骨細胞機能の評価



軟骨細胞機能は *Col2a1*、*Acan*、および *Mmp13* mRNA の発現で評価した。A. *Acan* mRNA 発現は TM 投与によって *Chop*^{+/+}、*Chop*^{-/-} 細胞ともに低下したが、*Chop*^{-/-} 細胞では *Chop*^{+/+} 細胞と比較して *Acan* mRNA 発現が有意に高かった。B. *Col2a1* mRNA は TM 投与により *Chop*^{+/+}、*Chop*^{-/-} 細胞ともに低下したが、*Chop*^{-/-} 細胞では *Chop*^{+/+} 細胞と比較して *Col2a1* mRNA 発現が高かった。C. *Mmp13* mRNA の発現は、TM 投与により *Chop*^{+/+}、*Chop*^{-/-} 細胞ともに増加したが、*Chop*^{-/-} 細胞では *Chop*^{+/+} 細胞と比較して *Mmp13* mRNA 発現は有意に低かった。* $p < 0.05$ 対 TM-、† $p < 0.05$ 対 *Chop*^{+/+} 軟骨細胞 (Student's *t*-test)

11. 参考文献

1. 厚生労働省. 平成 22 年 国民生活基礎調査の概況. 2010.
2. Yoshimura N, Muraki S, Oka H, Mabuchi A, En-Yo Y, Yoshida M, et al. 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* 2009; 27: 620-628.
3. Goldring MB. Update on the biology of the chondrocyte and new approaches to treating cartilage diseases. *Best Pract Res Clin Rheum* 2006; 20: 1003-1025.
4. Clouet J, Vinatier C, Merceron C, Pot-vaucel M, Maugars Y, Weiss P, et al. From osteoarthritis treatments to future regenerative therapies for cartilage. *Drug Discov Today* 2009; 14: 913-925.
5. Verzijl N, DeGroot J, Bank RA, Bayliss MT, Bijlsma JWI, Lefeber FPJG, et al. Age-related accumulation of the advanced glycation endproduct pentosidine in human articular cartilage aggrecan: the use of pentosidine levels as a quantitative measure of protein turnover. *Matrix Biol* 2001; 20: 409-417.
6. 津村 弘、池田 真一、片岡 晶志. 変形性膝関節症の危険因子と予防. *日本整形外科学会雑誌* 2009; 83: 982-986.
7. 木村 友厚. 変形性関節症の診断と病態のオーバービュー. *Geriatric Medicine* 2010; 48: 295-299.
8. Hampel U, Sesselmann S, Iserovich P, Sel S, Paulsen F, Sack R. Chemokine and cytokine levels in osteoarthritis and rheumatoid arthritis synovial fluid. *J Immunol Methods* 2013; 396: 134-139.
9. Lee AS, Ellman MB, Yan D, Kroin JS, Cole BJ, van Wijnen AJ, et al. A current review of molecular mechanisms regarding osteoarthritis and pain. *Gene* 2013; 527: 440-447.
10. Schmidt MB, Chen EH, Lynch SE. A review of the effects of insulin-like growth factor and platelet derived growth factor on in vivo cartilage healing and repair. *Osteoarthritis*

Cartilage 2006; 14: 403-412.

11. Wei L, Sun XJ, Wang Z, Chen Q. CD95-induced osteoarthritic chondrocyte apoptosis and necrosis: dependency on p38 mitogen-activated protein kinase. *Arthritis Res Ther* 2006; 8: R37.
12. Thomas CM, Fuller CJ, Whittles CE, Sharif M. Chondrocyte death by apoptosis is associated with cartilage matrix degradation. *Osteoarthritis Cartilage* 2007; 15: 27-34.
13. Kühn K. Cell death in cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 2004; 12: 1-16.
14. Del Carlo M, Loeser R. Cell death in osteoarthritis. *Curr Rheum Rep* 2008; 10: 37-42.
15. Hashimoto S, Ochs RL, Komiya S, Lotz M. Linkage of chondrocyte apoptosis and cartilage degradation in human osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 1998; 41: 1632-1638.
16. D'Lima D, Hermida J, Hashimoto S, Colwell C, Lotz M. Caspase inhibitors reduce severity of cartilage lesions in experimental osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2006; 54: 1814-1821.
17. Brenner D, Mak TW. Mitochondrial cell death effectors. *Curr Opin Cell Biol* 2009; 21: 871-877.
18. Pradelli L, Bénétteau M, Ricci J-E. Mitochondrial control of caspase-dependent and -independent cell death. *Cell Mol Life Sci* 2010; 67: 1589-1597.
19. Kleizen B, Braakman I. Protein folding and quality control in the endoplasmic reticulum. *Curr Opin Cell Biol* 2004; 16: 343-349.
20. Bukau B, Weissman J, Horwich A. Molecular chaperones and protein quality control. *Cell* 2006; 125: 443-451.
21. Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8: 519-529.
22. Fu HY, Okada K, Liao Y, Tsukamoto O, Isomura T, Asai M, et al. Ablation of C/EBP homologous protein attenuates endoplasmic reticulum-mediated apoptosis and cardiac dysfunction induced by pressure overload. *Circulation* 2010; 122: 361-369.
23. Oyadomari S, Koizumi A, Takeda K, Gotoh T, Akira S, Araki E, et al. Targeted disruption

- of the Chop gene delays endoplasmic reticulum stress-mediated diabetes. *J Clin Invest* 2002; 109: 525-532.
24. Namba T, Tanaka K-I, Ito Y, Ishihara T, Hoshino T, Gotoh T, et al. Positive role of CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein, a transcription factor involved in the endoplasmic reticulum stress response in the development of colitis. *Am J Pathol* 2009; 174: 1786-1798.
 25. Horton WE, Jr., Bennion P, Yang L. Cellular, molecular, and matrix changes in cartilage during aging and osteoarthritis. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2006; 6: 379-381.
 26. Ruiz-Romero C, Carreira V, Rego I, Remeseiro S, López-Armada MJ, Blanco FJ. Proteomic analysis of human osteoarthritic chondrocytes reveals protein changes in stress and glycolysis. *Proteomics* 2008; 8: 495-507.
 27. Yang L, Carlson SG, McBurney D, Horton WE, Jr. Multiple signals induce endoplasmic reticulum stress in both primary and immortalized chondrocytes resulting in loss of differentiation, impaired cell growth, and apoptosis. *J Biol Chem* 2005; 280: 31156-31165.
 28. Hamamura K, Goldring MB, Yokota H. Involvement of p38 MAPK in regulation of MMP13 mRNA in chondrocytes in response to surviving stress to endoplasmic reticulum. *Arch Oral Biol* 2009; 54: 279-286.
 29. Takada K, Hirose J, Senba K, Yamabe S, Oike Y, Gotoh T, et al. Enhanced apoptotic and reduced protective response in chondrocytes following endoplasmic reticulum stress in osteoarthritic cartilage. *Int J Exp Pathol* 2011; 92: 232-242.
 30. Takada K, Hirose J, Yamabe S, Uehara Y, Mizuta H. Endoplasmic reticulum stress mediates nitric oxide-induced chondrocyte apoptosis. *Biomed Rep* 2013; 1: 315-319.
 31. Oyadomari S, Takeda K, Takiguchi M, Gotoh T, Matsumoto M, Wada I, et al. Nitric oxide-induced apoptosis in pancreatic beta cells is mediated by the endoplasmic reticulum stress pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 10845-10850.
 32. Kamekura S, Hoshi K, Shimoaka T, Chung U, Chikuda H, Yamada T, et al. Osteoarthritis

- development in novel experimental mouse models induced by knee joint instability. *Osteoarthritis Cartilage* 2005; 13: 632-641.
33. Kozawa E, Nishida Y, Cheng XW, Urakawa H, Arai E, Futamura N, et al. Osteoarthritic change is delayed in a Ctsk-knockout mouse model of osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2012; 64: 454-464.
 34. Wimsey S, Lien CF, Sharma S, Brennan PA, Roach HI, Harper GD, et al. Changes in immunolocalisation of β -dystroglycan and specific degradative enzymes in the osteoarthritic synovium. *Osteoarthritis Cartilage* 2006; 14: 1181-1188.
 35. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275.
 36. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-254.
 37. Nugent AE, McBurney DL, Horton WE, Jr. The presence of extracellular matrix alters the chondrocyte response to endoplasmic reticulum stress. *J Cell Biochem* 2011; 112: 1118-1129.
 38. Oliver BL, Cronin CG, Zhang-Benoit Y, Goldring MB, Tanzer ML. Divergent stress responses to IL-1 β , nitric oxide, and tunicamycin by chondrocytes. *J Cell Physiol* 2005; 204: 45-50.
 39. Oyadomari S, Mori M. Roles of CHOP//GADD153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell Death Differ* 2003; 11: 381-389.
 40. Nakayama Y, Endo M, Tsukano H, Mori M, Oike Y, Gotoh T. Molecular mechanisms of the LPS-induced non-apoptotic ER stress-CHOP pathway. *J Biochem* 2010; 147: 471-483.
 41. Szegezdi E, Logue SE, Gorman AM, Samali A. Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO Rep* 2006; 7: 880-885.
 42. Galehdar Z, Swan P, Fuerth B, Callaghan SM, Park DS, Cregan SP. Neuronal apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress is regulated by ATF4-CHOP-mediated induction

- of the Bcl-2 homology 3-only member PUMA. *J Neurosci* 2010; 30: 16938-16948.
43. Yamaguchi H, Wang HG. CHOP is involved in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis by enhancing DR5 expression in human carcinoma cells. *J Biol Chem* 2004; 279: 45495-45502.
 44. Mackay AM, Beck SC, Murphy JM, Barry FP, Chichester CO, Pittenger MF. Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow. *Tissue Eng* 1998; 4: 415-428.
 45. Trowbridge JM, Gallo RL. Dermatan sulfate: new functions from an old glycosaminoglycan. *Glycobiology* 2002; 12: 117R-125R.
 46. D'Lima DD, Hashimoto S, Chen PC, Lotz MK, ColwellJr CW. Prevention of Chondrocyte Apoptosis. *J Bone Joint Surg* 2001; 83: S25-26.
 47. Ozcan U, Cao Q, Yilmaz E, Lee A-H, Iwakoshi NN, Ozdelen E, et al. Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science* 2004; 306: 457-461.
 48. Okada K, Minamino T, Tsukamoto Y, Liao Y, Tsukamoto O, Takashima S, et al. Prolonged endoplasmic reticulum stress in hypertrophic and failing heart after aortic constriction: possible contribution of endoplasmic reticulum stress to cardiac myocyte apoptosis. *Circulation* 2004; 110: 705-712.
 49. Ni M, Lee AS. ER chaperones in mammalian development and human diseases. *FEBS Lett* 2007; 581: 3641-3651.
 50. Szegezdi E, Logue SE, Gorman AM, Samali A. Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO Rep* 2006; 7: 880-885.
 51. Aigner T, McKenna L. Molecular pathology and pathobiology of osteoarthritic cartilage. *Cell Mol Life Sci* 2002; 59: 5-18.
 52. Glasson SS, Blanchet TJ, Morris EA. The surgical destabilization of the medial meniscus (DMM) model of osteoarthritis in the 129/SvEv mouse. *Osteoarthritis Cartilage* 2007; 15:

1061-1069.

53. Kamekura S, Kawasaki Y, Hoshi K, Shimoaka T, Chikuda H, Maruyama Z, et al. Contribution of runt-related transcription factor 2 to the pathogenesis of osteoarthritis in mice after induction of knee joint instability. *Arthritis Rheum* 2006; 54: 2462-2470.
54. Hayashida M, Okazaki K, Fukushi J, Sakamoto A, Iwamoto Y. CCAAT/enhancer binding protein beta mediates expression of matrix metalloproteinase 13 in human articular chondrocytes in inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum* 2009; 60: 708-716.
55. Ron D, Habener JF. CHOP, a novel developmentally regulated nuclear protein that dimerizes with transcription factors C/EBP and LAP and functions as a dominant-negative inhibitor of gene transcription. *Gene Dev* 1992; 6: 439-453.
56. Shimizu S, Asou Y, Itoh S, Chung UI, Kawaguchi H, Shinomiya K, et al. Prevention of cartilage destruction with intraarticular osteoclastogenesis inhibitory factor/osteoprotegerin in a murine model of osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2007; 56: 3358-3365.
57. Yamakawa K, Kamekura S, Kawamura N, Saegusa M, Kamei D, Murakami M, et al. Association of microsomal prostaglandin E synthase 1 deficiency with impaired fracture healing, but not with bone loss or osteoarthritis, in mouse models of skeletal disorders. *Arthritis Rheum* 2008; 58: 172-183.
58. Harding HP, Zhang Y, Zeng H, Novoa I, Lu PD, Calton M, et al. An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Mol Cell* 2003; 11: 619-633.