

15. Sato Y, Kasai T, Nakagawa S, Tanabe K, Watanabe T, Kawakami K, Takahashi Y: **Stable integration and conditional expression of electroporated transgenes in chicken embryos.** *Developmental biology* 2007, **305**:616-624.
16. Chuah MI, Au C: **Olfactory Schwann cells are derived from precursor cells in the olfactory epithelium.** *J Neurosci Res* 1991, **29**:172-180.
17. Ramon-Cueto A, Avila J: **Olfactory ensheathing glia: properties and function.** *Brain Res Bull* 1998, **46**:175-187.
18. Dymecki SM, Tomaszewicz H: **Using Flp-recombinase to characterize expansion of Wnt1-expressing neural progenitors in the mouse.** *Developmental biology* 1998, **201**:57-65.
19. Matsuoka T, Ahlberg PE, Kessarlis N, Iannarelli P, Dennehy U, Richardson WD, McMahon AP, Koentges G: **Neural crest origins of the neck and shoulder.** *Nature* 2005, **436**:347-355.
20. Danielian PS, Muccino D, Rowitch DH, Michael SK, McMahon AP: **Modification of gene activity in mouse embryos in utero by a tamoxifen-inducible form of Cre recombinase.** *Curr Biol* 1998, **8**:1323-1326.
21. Yamauchi Y, Abe K, Mantani A, Hitoshi Y, Suzuki M, Osuzu F, Kuratani S, Yamamura K: **A novel transgenic technique that allows specific marking of the neural crest cell lineage in mice.** *Developmental biology* 1999, **212**:191-203.
22. Yoshida S, Shimmura S, Nagoshi N, Fukuda K, Matsuzaki Y, Okano H, Tsubota K: **Isolation of multipotent neural crest-derived stem cells from the adult mouse cornea.** *Stem cells (Dayton, Ohio)* 2006, **24**:2714-2722.
23. Tomita Y, Matsumura K, Wakamatsu Y, Matsuzaki Y, Shibuya I, Kawaguchi H, Ieda M, Kanakubo S, Shimazaki T, Ogawa S, Osumi N, Okano H, Fukuda K: **Cardiac neural crest cells contribute to the dormant multipotent stem cell in the mammalian heart.** *J Cell Biol* 2005, **170**:1135-1146.
24. Nagoshi N, Shibata S, Kubota Y, Nakamura M, Nagai Y, Satoh E, Morikawa S, Okada Y, Mabuchi Y, Katoh H, Okada S, Fukuda K, Suda T, Matsuzaki Y, Toyama Y, Okano H: **Ontogeny and multipotency of neural crest-derived stem cells in mouse bone marrow, dorsal root ganglia, and whisker pad.** *Cell stem cell* 2008, **2**:392-403.
25. Asada N, Takase M, Nakamura J, Oguchi A, Asada M, Suzuki N, Yamamura K, Nagoshi N, Shibata S, Rao TN, Fehling HJ, Fukatsu A, Minegishi N, Kita T, Kimura T, Okano H, Yamamoto M, Yanagita M: **Dysfunction of fibroblasts of extra-renal origin underlies renal fibrosis and renal anemia in mice.** *J Clin Invest* .
26. Shibata S, Yasuda A, Renault-Mihara F, Suyama S, Katoh H, Inoue T, Inoue YU, Nagoshi N, Sato M, Nakamura M, Akazawa C, Okano H: **Sox10-Venus mice: a new tool for real-time labeling of neural crest lineage cells and oligodendrocytes.** *Mol Brain* 2010, **3**:31.
27. Le Douarin NM, Renaud D, Teillet MA, Le Douarin GH: **Cholinergic differentiation of presumptive adrenergic neuroblasts in interspecific chimeras after heterotopic transplantations.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1975, **72**:728-732.
28. Bronner-Fraser M, Sieber-Blum M, Cohen AM: **Clonal analysis of the avian neural crest: migration and maturation of mixed neural crest clones injected into host chicken embryos.** *J Comp Neurol* 1980, **193**:423-434.
29. Kawakami K, Noda T: **Transposition of the Tol2 element, an Ac-like element from the Japanese medaka fish *Oryzias latipes*, in mouse embryonic stem cells.** *Genetics* 2004, **166**:895-899.
30. Harada H, Takahashi Y, Kawakami K, Ogura T, Nakamura H: **Tracing retinal fiber trajectory with a method of transposon-mediated genomic integration in chick embryo.** *Development, growth & differentiation* 2008, **50**:697-702.
31. Del Barrio MG, Nieto MA: **Relative expression of Slug, RhoB, and HNK-1 in the cranial neural crest of the early chicken embryo.** *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists* 2004, **229**:136-139.
32. Beites CL, Kawauchi S, Crocker CE, Calof AL: **Identification and molecular regulation of neural stem cells in the olfactory epithelium.** *Experimental cell research* 2005, **306**:309-316.
33. Leung CT, Coulombe PA, Reed RR: **Contribution of olfactory neural stem cells to tissue maintenance and regeneration.** *Nature neuroscience* 2007, **10**:720-726.
34. Doucette JR, Kiernan JA, Flumerfelt BA: **The re-innervation of olfactory glomeruli following transection of primary olfactory axons in the central or peripheral nervous system.** *Journal of anatomy* 1983, **137**(Pt 1):1-19.
35. D'Amico-Martel A, Noden DM: **Contributions of placodal and neural crest cells to avian cranial peripheral ganglia.** *The American journal of anatomy* 1983, **166**:445-468.
36. Forni PE, Taylor-Burds C, Melvin S, Williams T, Wray S: **Neural Crest and Ectodermal Cells Intermix in the Nasal Placode to give rise to GnRH-1 Neurons, Sensory Neurons and Olfactory Ensheathing Cells.** *J Neuroscience* 2011, **31**:6915-6927.
37. Forni PE, Taylor-Burds C, Melvin S, Williams T, Wray S: **Neural Crest and Ectodermal Cells Intermix in the Nasal Placode to give rise to GnRH-1 Neurons, Sensory Neurons and Olfactory Ensheathing Cells.** *J Neuroscience*, **31**:6915-27, 2011..
38. Toma JG, Akhavan M, Fernandes KJ, Barnabe-Heider F, Sadikot A, Kaplan DR, Miller FD: **Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin.** *Nat Cell Biol* 2001, **3**:778-784.
39. Amoh Y, Li L, Katsuo K, Penman S, Hoffman RM: **Multipotent nestin-positive, keratin-negative hair-follicle bulge stem cells can form neurons.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005, **102**:5530-5534.
40. Kang SK, Putnam LA, Ylostalo J, Popescu IR, Dufour J, Belousov A, Bunnell BA: **Neurogenesis of Rhesus adipose stromal cells.** *J Cell Sci* 2004, **117**:4289-4299.
41. Roisen FJ, Klueber KM, Lu CL, Hatcher LM, Dozier A, Shields CB, Maguire S: **Adult human olfactory stem cells.** *Brain research* 2001, **890**:11-22.
42. Murrell W, Feron F, Wetzig A, Cameron N, Splatt K, Bellette B, Bianco J, Perry C, Lee G, Mackay-Sim A: **Multipotent stem cells from adult olfactory mucosa.** *Dev Dyn* 2005, **233**:496-515.
43. Nagoshi N, Shibata S, Hamanoue M, Mabuchi Y, Matsuzaki Y, Toyama Y, Nakamura M, Okano H: **Schwann cell plasticity after spinal cord injury shown by neural crest lineage tracing.** *Glia* 2011, **59**:771-784.
44. Real C, Glavieux-Pardanaud C, Vaigot P, Le-Douarin N, Dupin E: **The instability of the neural crest phenotypes: Schwann cells can differentiate into myofibroblasts.** *Int J Dev Biol* 2005, **49**:151-159.
45. Bixby S, Kruger GM, Mosher JT, Joseph NM, Morrison SJ: **Cell-intrinsic differences between stem cells from different regions of the peripheral nervous system regulate the generation of neural diversity.** *Neuron* 2002, **35**:643-656.
46. Morrison SJ, White PM, Zock C, Anderson DJ: **Prospective identification, isolation by flow cytometry, and in vivo self-renewal of multipotent mammalian neural crest stem cells.** *Cell* 1999, **96**:737-749.
47. Stemple DL, Anderson DJ: **Isolation of a stem cell for neurons and glia from the mammalian neural crest.** *Cell* 1992, **71**:973-985.
48. Suzuki K, Tanaka M, Watanabe N, Saito S, Nonaka H, Miyajima A: **p75 Neurotrophin receptor is a marker for precursors of stellate cells and portal fibroblasts in mouse fetal liver.** *Gastroenterology* 2008, **135**:270-281 e273.
49. Murdoch B, Roskams AJ: **Olfactory epithelium progenitors: insights from transgenic mice and in vitro biology.** *J Mol Histol* 2007, **38**:581-599.
50. Britsch S, Goerich DE, Riethmacher D, Peirano RI, Rosner M, Nave KA, Birchmeier C, Wegner M: **The transcription factor Sox10 is a key regulator of peripheral glial development.** *Genes Dev* 2001, **15**:66-78.
51. Paratore C, Goerich DE, Suter U, Wegner M, Sommer L: **Survival and glial fate acquisition of neural crest cells are regulated by an interplay between the transcription factor Sox10 and extrinsic combinatorial signaling.** *Development (Cambridge, England)* 2001, **128**:3949-3961.
52. Kuhlbrodt K, Herbarth B, Sock E, Hermans-Borgmeyer I, Wegner M: **Sox10, a novel transcriptional modulator in glial cells.** *J Neurosci* 1998, **18**:237-250.
53. Carter LA, MacDonald JL, Roskams AJ: **Olfactory horizontal basal cells demonstrate a conserved multipotent progenitor phenotype.** *J Neurosci* 2004, **24**:5670-5683.
54. Takashima Y, Era T, Nakao K, Kondo S, Kasuga M, Smith AG, Nishikawa S: **Neuroepithelial cells supply an initial transient wave of MSC differentiation.** *Cell* 2007, **129**:1377-1388.
55. Morikawa S, Mabuchi Y, Niibe K, Suzuki S, Nagoshi N, Sunabori T, Shimmura S, Nagai Y, Nakagawa T, Okano H, Matsuzaki Y: **Development of mesenchymal stem cells partially originate from the neural crest.** *Biochem Biophys Res Commun* 2009, **379**:1114-1119.
56. Dupin E, Sextier-Sainte-Claire Deville F, Nataf V, Le Douarin NM: **The ontogeny of the neural crest.** *C R Acad Sci III* 1993, **316**:1062-1081.
57. Kocsis JD, Lankford KL, Sasaki M, Radtke C: **Unique in vivo properties of olfactory ensheathing cells that may contribute to neural repair and protection following spinal cord injury.** *Neurosci Lett* 2009, **456**:137-142.

57. Mackay-Sim A, St John JA: **Olfactory ensheathing cells from the nose: clinical application in human spinal cord injuries.** *Experimental neurology* 2011, **229**:174-180.
58. Li L, Mignone J, Yang M, Matic M, Penman S, Enikolopov G, Hoffman RM: **Nestin expression in hair follicle sheath progenitor cells.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003, **100**:9958-9961.
59. Amoh Y, Kanoh M, Niiyama S, Kawahara K, Sato Y, Katsuoka K, Hoffman RM: **Human and mouse hair follicles contain both multipotent and monopotent stem cells.** *Cell Cycle* 2009, **8**:176-177.
60. Uchugonova A, Hoffman RM, Weinigel M, Koenig K: **Watching stem cells in the skin of living mice noninvasively.** *Cell Cycle* 2011, **10**:2017-2020.
61. Uchugonova A, Duong J, Zhang N, Konig K, Hoffman RM: **The bulge area is the origin of nestin-expressing pluripotent stem cells of the hair follicle.** *J Cell Biochem* 2011, **112**:2046-2050.
62. Amoh Y, Li L, Campillo R, Kawahara K, Katsuoka K, Penman S, Hoffman RM: **Implanted hair follicle stem cells form Schwann cells that support repair of severed peripheral nerves.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005, **102**:17734-17738.
63. Amoh Y, Li L, Katsuoka K, Hoffman RM: **Multipotent hair follicle stem cells promote repair of spinal cord injury and recovery of walking function.** *Cell Cycle* 2008, **7**:1865-1869.
64. Liu F, Uchugonova A, Kimura H, Zhang C, Zhao M, Zhang L, Koenig K, Duong J, Aki R, Saito N, Mii S, Amoh Y, Katsuoka K, Hoffman RM: **The bulge area is the major hair follicle source of nestin-expressing pluripotent stem cells which can repair the spinal cord compared to the dermal papilla.** *Cell Cycle* 2011, **10**:830-839.
65. Hamburger V, Hamilton HL: **A series of normal stages in the development of the chick embryo.** 1951. *Dev Dyn* 1992, **195**:231-272.
66. Okada Y, Shimazaki T, Sobue G, Okano H: **Retinoic-acid-concentration-dependent acquisition of neural cell identity during in vitro differentiation of mouse embryonic stem cells.** *Developmental biology* 2004, **275**:124-142.
67. Vescovi AL, Reynolds BA, Fraser DD, Weiss S: **bFGF regulates the proliferative fate of unipotent (neuronal) and bipotent (neuronal/astroglial) EGF-generated CNS progenitor cells.** *Neuron* 1993, **11**:951-966.

doi:10.1186/1756-6606-4-34

Cite this article as: Katoh *et al.*: The dual origin of the peripheral olfactory system: placode and neural crest. *Molecular Brain* 2011 **4**:34.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



軟骨細胞分化における miRNA

浅原 弘嗣*

マイクロRNAはノンコーディングRNAの一種であり、20～25塩基ほどの1本鎖RNAである。ターゲットとなる遺伝子の mRNA に結合し、その発現を抑制する機能を持ち、発生、がん、炎症などあらゆる医学・生物学分野において重要な役割を担うことが明らかにされてきている。

本稿では、特に軟骨細胞および関節軟骨組織の発生、および恒常性維持における miRNA の機能を紹介する。

Frontier of epigenome in bone research.

miRNAs in cartilage development.

Department of Systems BioMedicine, Tokyo Medical and Dental University/

Department of Systems BioMedicine, National Research Institute for Child Health and Development, Japan.

Hiroshi Asahara

MicroRNAs (miRs) are ~ 22 nucleotide non-coding forms of RNA and exhibit tissue or developmental stage specific expression patterns. Recent findings show that the expression of miR-140, which is specifically expressed in chondrocytes, is reduced in OA chondrocytes. Furthermore, knockdown of miR-140 in mice chondrocytes promotes arthritis in mice. In addition to this, several other miRs have also been shown to play important roles in chondrocytes. Thus, miRs should be critical factors for cartilage development and homeostasis.

はじめに

マイクロRNAはノンコーディングRNAの一種であり、20～25塩基ほどの1本鎖RNAである。ターゲットとなる遺伝子の mRNA に結合し、その発現を抑制する機能を持ち、発生、がん、炎症などあらゆる医学・生物学分野において重要な

役割を担うことが明らかにされてきている。

骨・軟骨の発生における miRNA の重要性

通常の mRNA と同様、miRNA はまず数百数千塩基長の pri-miRNA (primary microRNA) として転写され、さらに、その転写物がいくつかのス

*東京医科歯科大学医歯学総合研究科システム発生・再生医学分野・教授 / 国立成育医療研究センター研究所・客員研究部長 (あさはら・ひろし)

トップを経て成熟型の機能を持つmiRNAとなる。

核内でまず酵素DroshaとDGCR8により、stem-loop構造の70塩基程度のpre-miRNA (precursor miRNA)に切り出され、さらにそれがExportin-5によって細胞質に運ばれ、DicerおよびTRBP/PACT (transactivation-response element RNA-binding protein/protein activator of the interferon-induced protein kinase)により、20～25塩基のmiRNAを含む2本鎖RNAが生成される。この2本鎖RNAのうちmiRNA側のみがRISC (RNA-induced silencing complex)に結合することで、機能的(mature)miRNA-RISC複合体となる^{1) 2)}。

このようなプロセスにおいてDicerは、ほぼすべてのmiRNA生成に不可欠である。しかし、そのノックアウトマウスは胎生期7.5日で死亡するため³⁾、各組織におけるmiRNAの機能研究では、それぞれの組織におけるコンディショナルなDicerノックアウトマウスの解析が行われてきた。

Tabinらは、胎芽全域で特異的にCreを発現するPrx-CreマウスとDicer-Floxマウスを掛け合わせて、四肢特異的なDicerコンディショナルノックアウトマウスを作製し、このマウスの四肢における骨形成は、骨形成パターン自体は保たれていたものの、四肢の短小化がみられることを報告し、軟骨・骨形成においてmiRNAが重要であることを示唆した⁴⁾。

さらに、内軟骨性骨化初期での軟骨誘導におけるmiRNAの機能研究では、Kronenbergらは、Col2-CreマウスとDicer-Floxマウスを掛け合わせて軟骨特異的なmiRNAノックアウトマウスを作製し⁵⁾、このマウスには、内軟骨性骨化における軟骨の増殖が減少した結果、肥大軟骨細胞への移行が早まり、骨格の短小化が起きていることを

報告した⁵⁾。このように、軟骨発生分化においてもmiRNAが重要であることが明らかとなった。

■ 軟骨特異的な発現を示すmiRNA

発生期に組織特異的な発現をするmiRNAをシステムティックに解析する目的で、ゼブラフィッシュをモデルにホルマウントインサイチュアハイブリダイゼーション (whole mount *in situ* hybridization: WISH) を行った。結果、軟骨に発現を示すものについては、ユビキタスに発現するもの以外に、miR-146, 140*, 199a, 199a*, 145の報告がある⁶⁾。その中でも、140, 199a, 199a*については、メダカや、ニワトリでも軟骨での発現が報告されている⁷⁾。特に、miR-140は他の組織では発現が低く、軟骨のみに特異的な発現を示すことが、マウス胎児を用いたWISHによっても報告された⁸⁾。199a, 199a*については、small RNAのライブラリースクリーニングでマウス結合組織での発現が確認されている。miR-140の軟骨における機能については、ゼブラフィッシュを用いた解析においてplatelet-derived growth factor (PDGF)シグナルを介する軟骨分化制御機構が確認された⁹⁾。

軟骨細胞に特異的に働くmiRNAを同定するため、われわれは、ヒト関節軟骨を用いたmiRNAに対するマイクロアレイ解析を行い、軟骨分化におけるmiR-140のより特異的な発現上昇を確認している¹⁰⁾。また、miR-140の発現はMSCsの軟骨分化と正相関し、分化に伴ってSox9, Col2a1のような軟骨分化マーカーと同じ発現増加を示すことも明らかとなった。

■ miR-140と発生・軟骨ホメオスタシス(図)

miR-140は正常ヒト関節軟骨で高い発現を示

pri-miRNA : primary microRNA, pre-miRNA : precursor miRNA

TRBP/PACT : transactivation-response element RNA-binding protein/protein activator of the interferon-induced protein kinase, RISC : RNA-induced silencing complex, WISH : whole mount *in situ* hybridization

PDGF : platelet-derived growth factor (血小板由来増殖因子)

す一方、変形性関節症 (OA) 軟骨においてはその発現量は有意に低下しており、IL1-βによる関節軟骨細胞刺激においても miR-140 の発現は低下することが確認された¹⁰⁾。これらの結果から、miR-140 の発現低下が OA における病的な遺伝子発現の誘因となっており、miR-140 が OA の病態と関連していることが示唆される¹⁰⁾。

そのためわれわれは、miR-140 ノックアウトマウスとトランスジェニックマウスを作製し、miR-140 の機能解析を行った。結果、miR-140 ノックアウトマウスは発生異常は認められなかったものの、生後、四肢、体幹、顔面の短小化がみられ、Dicer ノックアウトマウスでみられた表現型の一部が miR-140 で説明できることを確認した¹¹⁾。

同様の表現型は、われわれとは別の miR-140 ノックアウトマウスでも報告されている¹²⁾。これらの結果から、miR-140 が内軟骨性骨成長に不可欠であり、Dnpep を介した bone morphogenetic protein (BMP) シグナル抑制が、その原因の一つとして考えられた。

また、肢芽のマイクロマスカルチャーにおける miR-140 ノックダウン解析では、BMP シグナルの下流で働く Sp1 によって軟骨細胞増殖が低下することが報告されており¹³⁾、miR-140 が内軟骨性骨成長において、Dnpep, SP1, BMP2 といった複数の遺伝子をターゲットとして働いていることが明らかとなった。早期の OA では関節軟骨の変化のみならず、軟骨下骨の肥厚、柔軟性の

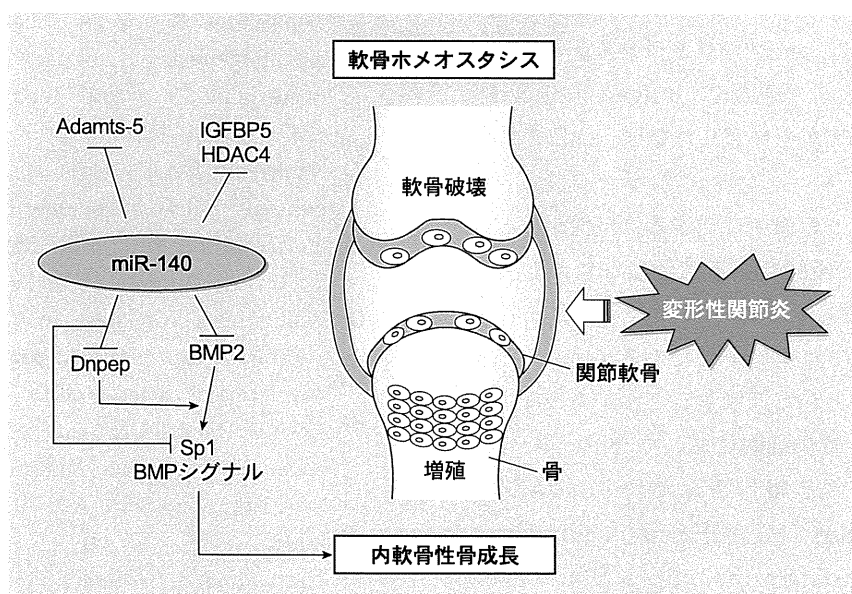


図 miR-140 を介した軟骨発生・代謝制御機構

miR-140 は、異なるターゲットを制御することで、内軟骨骨化と軟骨ホメオスタシスの両方を調節することができる。

BMP : bone morphogenetic protein, HDAC4 : histone deacetylase 4, IGFBP5 : insulin-like growth factor binding protein 5

(文献 11 より)

OA : osteoarthritis (変形性関節症), BMP : bone morphogenetic protein, AIA : antigen-induced arthritis
 HDAC4 : histone deacetylase 4 (ヒストン脱アセチル化酵素 4)
 IGFBP5 : insulin-like growth factor binding protein 5 (インスリン様増殖因子結合タンパク質 5)

低下, 骨梁の減少なども起きており, OA 軟骨における miR-140 の発現の低下が, BMP シグナルを介して軟骨下骨の変性にも関与していることが示唆される。これらの変性によるストレスの増加が, 関節軟骨の変性を促進させ OA の進行につながっているとする報告もある¹⁴⁾。

軟骨ホメオスタシスにおける miR-140 の役割を明らかにするため, 時間軸での miR-140 の変化を調べた結果, 膝関節軟骨は生後 1 カ月まで正常であったが, 3 カ月以降は徐々にプロテオグリカンの減少や軟骨のフィブリレーションなどの OA の進行が確認された。また, サージカル OA モデルにおいても, miR-140 ノックアウトマウスは術後 8 週で wild type マウスと比べ有意に OA の進行が確認された。さらに miR-140 の軟骨変性への効果を調べるため, wild type マウス, miR-140 ノックアウトマウス, miR-140 トランスジェニックマウスそれぞれの膝関節に antigen-induced arthritis (AIA) モデルを作製した結果, miR-140 トランスジェニックマウスではプロテオグリカンと type-II collagen の減少に対する抵抗性が確認され, miR-140 が炎症による軟骨変性に対して予防効果を持つことが示唆された¹¹⁾。miR-140 が, OA の主要なプロテアーゼである Adamts-5 を直接の標的分子として抑制することがこの理由の一つであるが, 軟骨細胞において miR-140 によって抑制されると報告されている HDAC4 (histone deacetylase 4), IGFBP5 (insulin-like growth factor binding protein 5) や BMP シグナルなどもこの結果の一因となっていると考えられる^{10)~14)}。このように miR-140 は, 複数の pathway において多数の遺伝子をターゲットにしていることが明らかとなっており, 軟骨実質の生成や分解を調節し, 軟骨のホメオスタシスを維持する主要な miRNA であると言える。

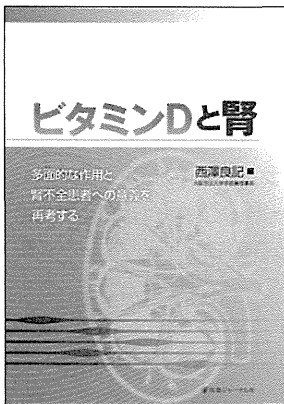
おわりに

miR-140 による軟骨治療は, 早期の OA に対して理想的な治療薬となる可能性を秘めており, 今後の研究が期待される。

文 献

- 1) Carthew RW, Sontheimer EJ: Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* **136**: 642-655, 2009.
- 2) Siomi H, Siomi MC: On the road to reading the RNA-interference code. *Nature* **457** (7228): 396-404, 2009.
- 3) Bernstein E, Kim SY, Carmell MA, et al: Dicer is essential for mouse development. *Nat Genet* **35**: 215-217, 2003.
- 4) Harfe BD, McManus MT, Mansfield JH, et al: The RNase III enzyme Dicer is required for morphogenesis but not patterning of the vertebrate limb. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102** (31): 10898-10903, 2005.
- 5) Kobayashi T, Lu J, Cobb BS, et al: Dicer-dependent pathways regulate chondrocyte proliferation and differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105** (6): 1949-1954, 2008.
- 6) Wienholds E, Kloosterman WP, Miska E, et al: MicroRNA expression in zebrafish embryonic development. *Science* **309**: 310-311, 2005.
- 7) Ason B, Darnell DK, Wittbrodt B, et al: Differences in vertebrate microRNA expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 14385-14389, 2006.
- 8) Tuddenham L, Wheeler G, Ntounia-Fousara S, et al: The cartilage specific microRNA-140 targets histone deacetylase 4 in mouse cells. *FEBS Lett* **580**: 4214-4217, 2006.
- 9) Eberhart JK, He X, Swartz ME, et al: MicroRNA Mirn140 modulates Pdgf signaling during palatogenesis. *Nat Genet* **40**: 290-298, 2008.
- 10) Miyaki S, Nakasa T, Otski S, et al: MicroRNA-140 is expressed in differentiated human articular chondrocytes and modulates IL-1 re-

- sponses. Arthritis Rheum **60** (9) :2723-2730, 2009.
- 11) Miyaki S, Sato T, Inoue A, et al : MicroRNA-140 plays dual roles in both cartilage development and homeostasis. Genes Dev **24** : 1173-1185, 2010.
- 12) Nakamura Y, Inloes JB, Katagiri T, Kobayashi T : Chondrocyte-specific microRNA-140 regulates endochondral bone development and targets Dnpep to modulate bone morphogenetic protein signaling. Mol Cell Biol **31** : 3019-3028, 2011.
- 13) Yang J, Qin S, Yi C, et al : MiR-140 is co-expressed with Wwp2-C transcript and activated by Sox9 to target Sp1 in maintaining the chondrocyte proliferation. FEBS Lett **585** : 2992-2997, 2011.
- 14) Araldi E, Schipani E : MicroRNA-140 and the silencing of osteoarthritis. Genes Dev **24** : 1075-1080, 2010.



ビタミンDと腎

— 多面的な作用と腎不全患者への意義を再考する —

大阪市立大学学長兼理事長 西澤 良記 編

A4判 168頁 定価 4,410円 (本体 4,200円+税5%) 送料実費
ISBN978-4-7532-2451-7 C3047

おもな内容

- I. 栄養学の観点から**
 ビタミンD作用における 25(OH)D の栄養指標および臨床指標としての意義
 (1) ビタミンD不足・充足の栄養指標としての 25(OH)D の意義
 (2) 骨密度低下・骨折予知のためのバイオマーカーとしての 25(OH)D の意義
 (3) ビタミンDの転倒予防効果
- II. 分子生物学的観点から**
 ビタミンDの分子作用機序に関する最近の進歩
 (1) ビタミンDによる転写制御の分子機構
 (2) VDR の高次機能
 (3) ビタミンDによる non-genomic action
- III. 多面的作用について**
 ビタミンDの作用、基礎と臨床
 (1) ビタミンDの古典的作用
 ~基礎と臨床から~
- (2) ビタミンDの非古典的作用
 ~基礎の面から~
- (3) ビタミンDの非古典的作用
 ~臨床の面から~
- IV. CKD-MBD の観点から**
 CKD-MBD という新しい概念
 (1) ビタミンDのCKD-MBD発症における役割
 (2) CKD-MBDにおける骨病変
 (3) CKD-MBD診療のエビデンスとガイドライン
- V. 臨床的観点から**
 静注ビタミンDが登場した歴史的背景
 (1) 静注用ビタミンD製剤に期待された効果とその成果
 (2) 静注用ビタミンD製剤副甲状腺内局注療法の開発
 (3) ビタミンD治療~今後の展望~

株式会社 医薬ジャーナル社 〒541-0047 大阪市中央区淡路町3丁目1番5号・淡路町ビル21 電話 06(6202)7280(代) FAX 06(6202)5295 (振替番号)
 〒101-0061 東京都千代田区三崎町3丁目3番1号・TKiビル 電話 03(3265)7681(代) FAX 03(3265)8369 (00910-1-33353)
<http://www.iyaku-j.com/> 書籍・雑誌バックナンバー検索, ご注文などはインターネットホームページからが便利です。

1. Whole mount *in situ* hybridization (WISH) を用いた軟骨発生・分化における遺伝子ネットワークの解明

味八木 茂* 浅原 弘嗣**

組織発生における分子ネットワークを明らかにするために用いられるポストゲノミックな手法として、個々の細胞種あるいは組織でのマイクロアレイ解析や時空間的な発現パターンを同定する *in situ* ハイブリダイゼーション法がある。マイクロアレイ解析に比べ、システムティックな *in situ* ハイブリダイゼーション解析は、組織でのより空間的な遺伝子制御に関する情報をもたらし、その結果、転写遺伝子のクラスターの同定に繋がる。我々は筋骨格系の発達が著しい時期のマウス胎仔を用いて、転写因子、コファクターおよび microRNA を含む WISH データベースを構築した。WISH を用いた我々のアプローチにより、筋分化でのフィードバックメカニズム、腱の発生や軟骨の恒常性において、重要な役割を担う新たな制御因子とネットワークが明らかになった。

Cutting edge on research of cartilage metabolism.

Analysis of molecular network in chondrocytes by WISH.

The Scripps Research Institute.

Shigeru Miyaki

National Research Institute for Children and Development / The Scripps Research Institute.

Hiroshi Asahara

One postgenomic strategy used to identify molecular networks functioning in tissue development is microarray analysis of individual cell types or tissues followed by *in situ* hybridization to identify temporal and spatial gene expression patterns. Compared with microarray analysis, the systematic *in situ* hybridization database presented here provides more detailed information on the spatial regulation of gene expression and allows identification of discrete clusters of transcribed genes. We created a whole-mount *in situ* hybridization (WISH) database, containing expression data of transcription factors, cofactors and microRNA expressed in mouse embryos a highly dynamic stage of skeletogenesis. Our approach, WISH provided us new regulators as a critical effector in a myogenic feedback mechanism, tendon development and cartilage homeostasis.

*スクリプス研究所 シニアリサーチアソシエート (みやき・しげる)

**国立成育研究医療センター システム発生・再生医学研究所・部長 / スクリプス研究所・主任研究員 (あさはら・ひろし)

はじめに

骨軟骨発生は、個体の形づくりに重要な役割を果たしている。それゆえ、先天性疾患機序の解明や、軟骨再生、関節疾患治療法の開発のためにも、軟骨発生・分化の分子生物学的なさらなる研究が必要とされている。たとえば、軟骨において最も重要な転写因子である *Sox9* は、その下流遺伝子群をどのように制御しているか、どのようなネットワークを形成して、時期特異的および組織特異的にどう機能するのかなどは、未だ明らかになってはいない。我々は、複数のポストゲノムの手法を開発あるいは導入し、それらを組み合わせることで、四肢発生に重要な役割を果たす軟骨発生・分化を決定する転写ネットワーク解明を目指し、以下のアプローチを行っている。

(1) 全転写制御因子および microRNA (以下 miRNA と略す) に対して、胚発生における Whole mount *in situ* ハイブリダイゼーション (以下 WISH[※]と記述) を行い、データベースを構築。

(2) 抽出された遺伝子の機能情報を得るため、ChIP on Chip および ChIP-Sequence 解析、ハイスループット遺伝子導入解析の2つのポストゲノミックアプローチを確立し、ゲノムワイドかつ高速な解析。

そのなかでも WISH による成果の一部をここに紹介する。

Whole mount *in situ* hybridization (WISH)

ポストゲノム研究の重要な課題でもある個々の分子機能の解明において、その目的分子の生体内における発現の局在やその経時的変化を把握することは、我々に重要で多くの情報をもたらす。また、我々の目指す分子ネットワークの同定、解析においては、中心となる分子と協調して作用する分子の探索が重要であるが、目的分子と同時期に

同局在を示す遺伝子群を分類することで、ネットワークに関わる分子を効率よくスクリーニングできる。

1. WISH の利点

タンパク質の局在を見る場合は、抗体を用いた免疫染色法を、遺伝子発現の局在を見る場合は、そのアンチセンスプローブを用いた *in situ* ハイブリダイゼーション法などを行う。これには、組織を剥切した薄い切断面での発現を見る組織切片法と、固定した胚を用いた全身における発現を調べるホールマウント法とに大別できる。現在、さまざまなモデル生物を用いた遺伝子発現データベース作製が全世界で進行中である。例えば、マイクロアレイ法を用いた発現データベースは、各組織・臓器、あるいは細胞ごとの膨大な発現データを含蓄し、さまざまな側面から利用されている。

しかしながら、これらのデータベースは、詳細な発現部位を特定することは困難であるという欠点がある。それに比べて、*in situ* ハイブリダイゼーション法では、細胞レベルでの微小な発現位置まで視覚的に特定できるという利点がある。中でも WISH 法は、あらゆる組織・臓器における発現を1個体、1回の解析で捉えることができるという点で、マイクロアレイ法では困難な視覚的な発現位置情報を与えてくれる。これまでに、いくつかのグループにより、さまざまなモデル生物を用いた WISH 法によるデータベースが構築されてきた。しかし、これらの多くは、さまざまな研究者による「投稿型」であることから、実験条件が一定ではなく、比較・解析が難しいという短所があった。

2. WISH データベースの構築

そこで、我々は遺伝子発現を制御するスイッチ

WISH : whole-mount *in situ* hybridization (胚発生における whole-mount *in situ* ハイブリダイゼーション)

ともいうべき役割を果たす転写因子群(転写因子, 転写コファクター)の網羅的な発現解析をマウス胚を用いて行った。この我々が独自に行った WISH データベース作製は, 転写因子群のリスト作製からはじまり, プローブ作製に用いた cDNA のクローンは, 合計 1,670 クローンに達した。プローブ作製などの詳細は文献を参照していただきたい¹⁾。この約 1,600 種類の転写因子について WISH を行った結果, 胚全体でいずれかの組織に明瞭な発現がある転写因子は 962 遺伝子, 肢芽に発現がある転写因子は 691 遺伝子に及んだ。我々は, このデータベースを「EMBRYS」と命名し, 25,000 枚を超える画像とともにオープンアクセスとして全世界に公開している (<http://embrys.jp>)。

(<http://embrys/html/MainMenu.html>)。(図 1)

我々はこの EMBRYS を通して, 筋の発生・分化のマスター遺伝子である転写因子 *MyoD* や *Myogenin* と同じ発現様式を示した転写抑制因子である *RP58* を同定した。この *RP58* の機能は, *Id2/3* をはじめとした筋分化の際に不要となる遺伝子群の転写抑制に働くことである。これまで知られていた *MyoD* → *Myogenin* → 筋最終分化遺伝子発現という, “正の” 遺伝子発現カスケードに加えて, *MyoD* が *RP58* の発現を誘導し, *RP58* が *Id2/3* の発現を抑制するという, “負の” 遺伝子制御のネットワークが *MyoD* より下流の筋分化過程に存在することを提唱した²⁾。さらに, 腱における新規の転写因子 *Mohawk (Mkx)* を同定し, そのノック

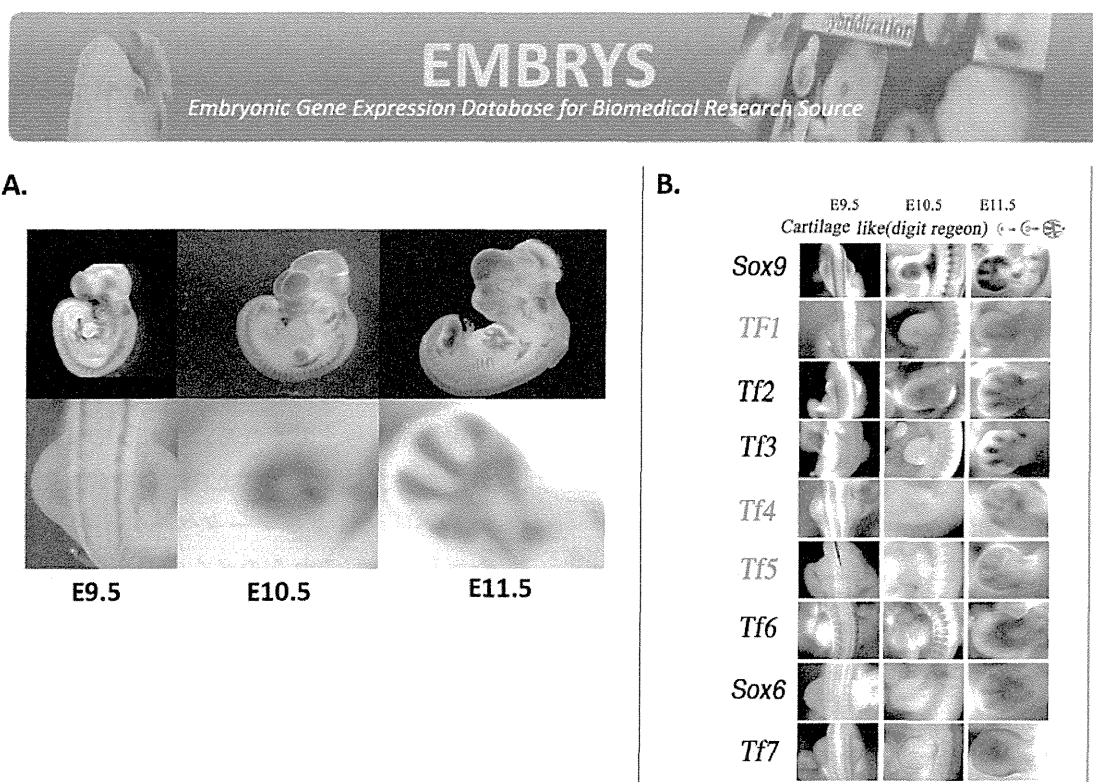


図 1 WISH データベース EMBRYS の構築

A. 3ステージのマウス胚の WISH 例, 軟骨マスター転写因子 *Sox9*

B. *Sox9* と同期して発現している転写制御因子群

(<http://embrys.jp/embrys/html/MainMenu.html> より)

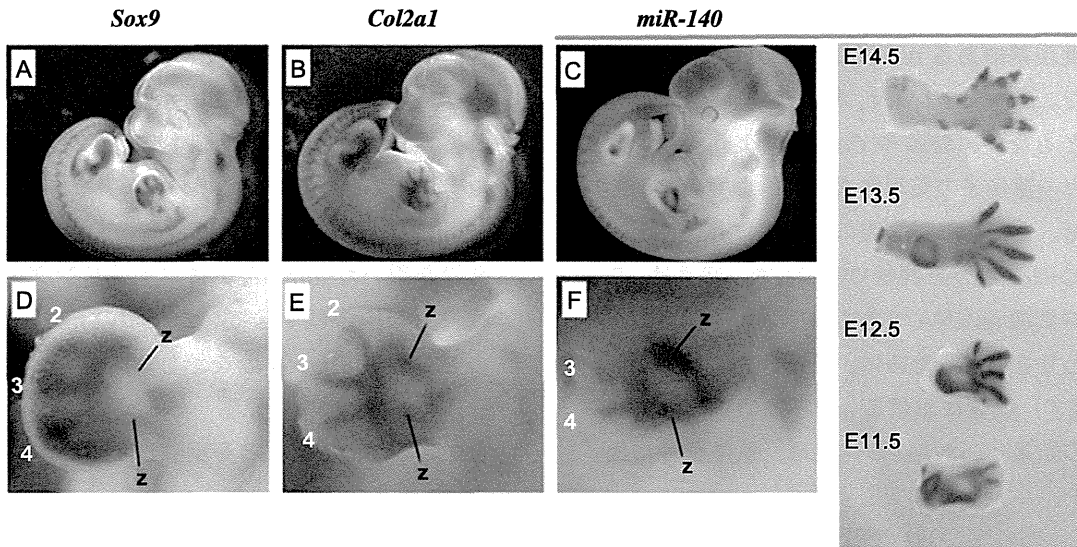


図2 マウス発生期における miR-140 の発現様式

転写因子 *Sox9* (A, D) と *Col2a1* (B, E), *miR-140* (C, F) の発現様式の比較 (E11.5)。上肢における *miR-140* の発現変化 (E11.5 ~ E14.5)。 (筆者ら提供)

アウト (KO) マウスを世界に先駆けて報告した³⁾。この *Mkx* KO マウスは、全身における腱の低形成が引き起こされることから、これまで腱の発生・分化に関与する唯一とあってよい転写因子、*Scx* の機能に加えて⁴⁾、この *Mkx* が、腱の発生、再生および修復を理解する上で有用な新たな遺伝子になると期待される。

microRNAs

近年、多くの生物学的プロセスや疾患に関わっているとされるノンコーディング RNA である microRNA は、多くの分野で注目されている。miRNAs は、タンパク質をコードしない低分子 RNA であり、ヒトではこれまでに 500 種類以上の miRNA が同定されている。これらの miRNA は、標的となる複数の遺伝子の発現を抑制的に制御することが知られており、新たな制御因子であることがわかってきた。そして、いくつかの

miRNA は組織特異的な発現様式を示し、その組織形成や機能に深く影響することで発生・分化や疾患などさまざまな生命現象に深く関与することが次第に明らかになってきている⁵⁾。

しかし、miRNA による病理生理的機能の詳細はまだまだ明らかになっていない。我々は、WISH を用いていくつかの miRNA についてその発現解析を行ったところ、軟骨発生・分化に必須である転写因子 *Sox9* と同様な発現様式を示す *miR-140* に注目した(図2)。この miRNA は、ゼブラフィッシュやマウス発生期において軟骨形成領域特異的に発現することが他のグループからも報告されている^{6) 7)}。

1. miR-140 の軟骨での発現

我々は、ヒト軟骨細胞とヒト骨髄由来間葉系幹細胞(以下 MSC^註と略す)における miRNAs の発現を miRNA マイクロアレイ解析により比較した

MSC : mesenchymal stem cell (間葉系幹細胞)

ところ、軟骨細胞で高発現しており、MSCとの間で最も発現差のある miRNA としても *miR-140* が示された。この *miR-140* は、MSC による軟骨分化誘導にともない、*Sox9* や *Col2a1* のような軟骨分化マーカー遺伝子の発現様式と同様な発現の増加を示した。また、軟骨細胞の脱分化に伴い、その発現は *Col2a1* などと同様に減少した。我々は、この軟骨特異的 miRNA である *miR-140* と関節疾患との関わりを調べるために、変形性関節症（以下 OA と略す）軟骨における *miR-140* の発現を調べた。その結果、*miR-140* の発現は、正常軟骨に比

べ、OA 患者の軟骨でその発現が低下していること、また、軟骨細胞への IL-1 β 刺激は、*miR-140* の発現を低下させることも示し、OA 軟骨で見られる遺伝子発現の異常に関与することを報告した⁸⁾。

Illipolis らも、正常関節軟骨と OA 患者由来の軟骨を用いた miRNA プロファイリング中に OA 軟骨で発現の低下していた 7 つの miRNAs の中の一つとして *miR-140* を示した⁹⁾。これらの情報は、*miR-140* が軟骨発生・分化や OA 発症になんらかの関与があることを示唆した。

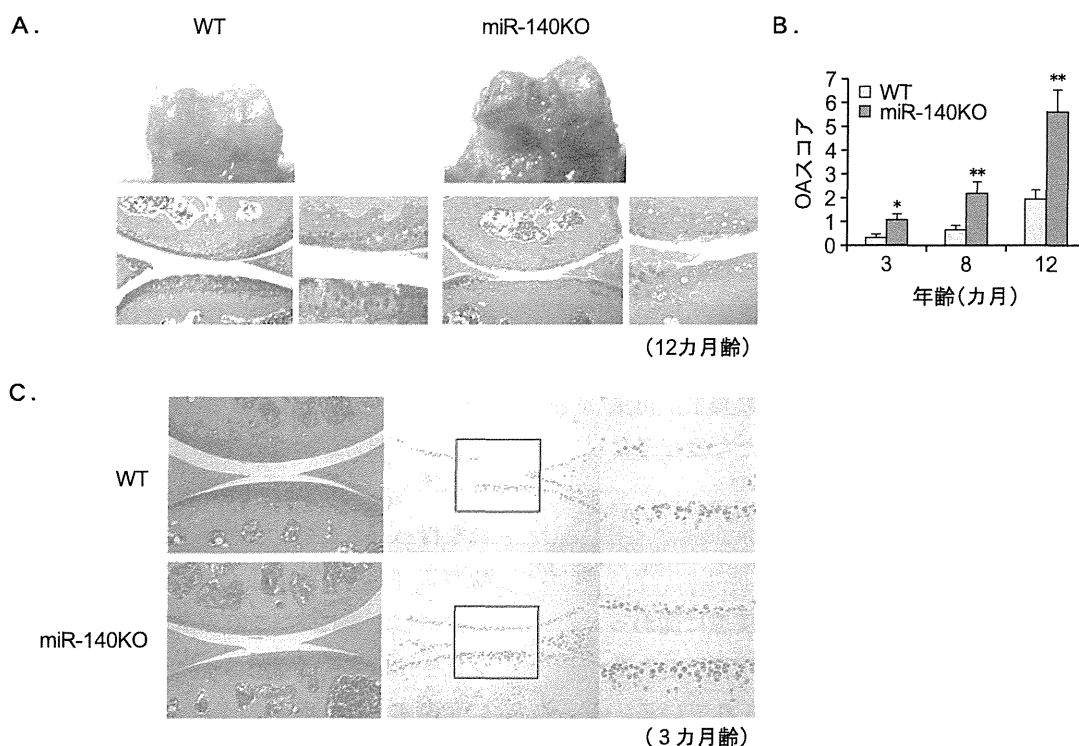


図3 miR-140 ノックアウト (KO) マウスの加齢による膝関節軟骨の変形性関節症 (OA) 様変化

A. miR-140 KO マウスは、加齢にともないプロテオグリカンの低下が進行し 12 カ月齢では軟骨破壊がみられる。

B. 加齢による WT と 140 KO マウスの OA スコア比較。

C. miR-140 KO マウス (3 カ月齢) の関節軟骨では、ADAMTS-5 の発現が増加している。

(巻頭カラーグラフィック5頁参照)

(文献 12 より改変)

OA : osteoarthritis (変形性関節症)

2. miR-140 ノックアウトマウスの表現系

そこで、我々は miR-140 の遺伝子改変マウスを作製し、軟骨発生や OA 発症への関与を解析した。発生期における miR-140 KO マウスは、顕著な骨格異常などはみられなかったが、出生後1カ月までに低身長や頭蓋顔面異常を伴う軽度な骨格異常を呈した。この原因の一つとして、軟骨細胞の増殖遅延が示唆されたが、関節軟骨をはじめとした関節の形態や構造には異常がみられなかった。これまで、OA 発症、進行には、主に加齢による軟骨の恒常性(アナボリックとカタボリック)バランスの変化、外傷などによるメカニカルストレスの増大、関節内における炎症などが重要であると考えられている。そこで、KO マウスを用いた加齢モデル、靭帯切除によるメカニカルストレス過負荷モデル、炎症誘発モデルによる膝関節を解析した。

興味深いことに加齢モデルにおける膝関節軟骨は、3カ月齢マウスにおいて徐々に軟骨基質であるプロテオグリカンの低下が観察され、8カ月齢ではプロテオグリカンの低下を伴う軟骨変性が進行していた。さらに12カ月齢マウスでは、激しい軟骨破壊が観察された(図3)。メカニカルストレス過負荷モデルにおいても KO マウスは、野生型(WT)に比べて軟骨変性が有意に進行することを示した。

3. miR-140 と OA

次に、一過性の炎症誘発モデルにおいても KO マウスは、野生型に比べて軟骨変性が進行していた。一方、興味深いことに miR-140 を過剰発現する TG マウスは、野生型に比べ軟骨変性の進行が抑制されていた。

ではなぜ KO マウスは、OA 様の症状を示したのであろうか? このメカニズムを明らかにするために、miR-140 がその発現を抑制的に作用する標的遺伝子を同定することは重要な情報を与える

と考えられる。我々は、WT マウスと KO マウスの軟骨細胞を用いたマイクロアレー解析および標的遺伝子予測アルゴリズム“TargetScan”などを用いて miR-140 の標的遺伝子となる候補を絞り込んだ。

OA の所見は軟骨基質であるプロテオグリカンの変性であり、そのプロテオグリカンを分解する主な酵素が ADAMTS-5 である。この Adamts-5 KO マウスは OA を引き起こさないことから、OA における ADAMTS-5 の重要性が示された^{10) 11)}。我々はこの Adamts-5 が miR-140 の標的遺伝子候補の中にあることをみつけ、その詳細を調べたところ、miR-140 が標的遺伝子の一つとして直接的に Adamts-5 を制御していることにより、プロテオグリカンの分解に影響を及ぼしていることを明らかにした。

つまり、miR-140 KO マウスは、加齢やメカニカルストレス、炎症などによる軟骨におけるカタボリックな因子の増大を制御できなくなり、軟骨代謝の恒常性バランスを崩すことによって OA が発症することを提唱した¹²⁾。

4. miR-140 の発現制御

それでは、この miR-140 の発現はどのように制御されているのだろうか。miR-140 の発現は、WISH の結果からも Sox9 の発現時期から少し遅れて軟骨特異的な発現様式を示すことから、SOX9 による制御の可能性について調べた。その結果、miR-140 の転写開始点の近傍に SOX9 結合領域を3つ同定し、その領域の SOX9 または SOX5, SOX6 トリオによる転写活性が示された。また、この領域を LacZ の上流に結合させたトランスジェニックマウスは、軟骨特異的な発現様式を示すことから、この領域への SOX9 の結合は、miR-140 を軟骨特異的に発現させるために重要な領域であることが示された(投稿準備中)。また、Dudek らは、miR-675 が軟骨特異的な発現

パターンを示し、軟骨細胞の脱分化によりその発現を減少させることを示した。そして、この miR-675 の発現は、SOX9 によって制御され、Col2a1 の発現は miR-675 によってポジティブに制御されることを報告している¹³⁾。このように SOX9 は、Col2a1 のような軟骨基質をコードする遺伝子群を直接的に制御するだけでなく、miRNA のようなノンコーディング RNA の発現をも制御し、転写ネットワークを形成することで軟骨分化および恒常性を司っていることが明らかになってきた。

5. miRNA による軟骨の遺伝子ネットワーク

SOX9 を起点とする軟骨発生・分化における転写ネットワークを miRNA のようなノンコーディング RNA を含む転写産物について、ChIP-Sequence を用いた解析や細胞ベースのシステムティックな遺伝子機能スクリーニングを駆使することで、これまでの“正の”遺伝子発現カスケードに加えて、今までよく分っていなかった転写抑制因子や miRNA による“負の”遺伝子制御ネットワークの存在とその重要性が、今後、次第に明らかになってくるであろう。軟骨における遺伝子ネットワークの解明は、骨軟骨細胞分化を促すシグナルや恒常性を保つシグナルの同定を導き出し、いまだ十分な治療法の存在しない OA など関節疾患の創薬シーズの探索や再生医療にも寄与できると考える。

おわりに

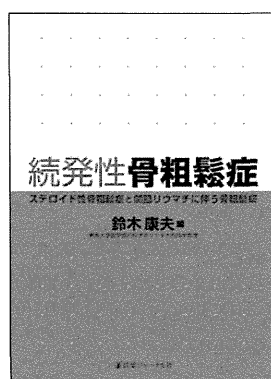
ポストゲノム研究においては、ほぼ全ての遺伝子に背番号が与えられたことにより、これら全ての遺伝子の自空間的、生理病理的な機能がくまなく解析できるようになった。マイクロアレイに加えて、個体レベルでの遺伝子発現情報や遺伝子機能を発現しての大量解析が重要となってきた。もうひとつの“ポストゲノム研究”は、まだ

知られていなかった遺伝子群、例えばノンコーディング RNA に代表される新しい遺伝子機能を発見、解明することであろう。これら二つの新しい研究戦略が合わさることで、詳細な軟骨の発生と疾患病態の分子機構が明らかになり、ひいては関節疾患の再生・再建医療にも貢献できるようになることが期待される。

文 献

- 1) 横山成俊, 浅原弘嗣: EMBRYOS: 発生過程の転写因子発現パターンの網羅的データベース構築. 細胞工学 **29** (9): 920-927, 2010.
- 2) Yokoyama S, Ito Y, Ueno-Kudo H, et al: A systems approach reveals that the myogenesis genome network is regulated by the transcriptional repressor RP58. Dev Cell **17** (6): 836-848, 2009.
- 3) Ito Y, Toriuchi N, Yoshitaka T, et al: The Mohawk homeobox gene is a critical regulator of tendon differentiation. Proc Natl Acad Sci U S A **107** (23): 10538-10542, 2010.
- 4) Murchison ND, Price BA, Conner DA, et al: Regulation of tendon differentiation by scleraxis distinguishes force-transmitting tendons from muscle-anchoring tendons. Development **134** (14): 2697-2708, 2007.
- 5) Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. Cell **136** (2): 215-233, 2009.
- 6) Wienholds E, Kloosterman WP, Miska E, et al: MicroRNA expression in zebrafish embryonic development. Science **309** (5732): 310-301, 2005.
- 7) Tuddenham L, Wheeler G, Ntounia-Fousara S, et al: The cartilage specific microRNA-140 targets histone deacetylase 4 in mouse cells. FEBS Lett **580** (17): 4214-4217, 2006.
- 8) Miyaki S, Nakasa T, Otsuki S, et al: Micro RNA-140 is expressed in differentiated hu-

- man articular chondrocytes and modulates interleukin-1 responses. *Arthritis Rheum* **60** (9) : 2723-2730, 2009.
- 9) Iliopoulos D, Malizos KN, Oikonomou P, et al : Integrative microRNA and proteomic approaches identify novel osteoarthritis genes and their collaborative metabolic and inflammatory networks. *PLoS One* **3** (11) : e3740, 2008.
- 10) Glasson SS, Askew R, Sheppard B, et al : Deletion of active ADAMTS5 prevents cartilage degradation in a murine model of osteoarthritis. *Nature* **434** (7033) : 644-648, 2005.
- 11) Stanton H, Rogerson FM, East CJ, et al : ADAMTS5 is the major aggrecanase in mouse cartilage in vivo and in vitro. *Nature* **434** (7033) : 648-652, 2005.
- 12) Miyaki S, Sato T, Inoue A, et al : MicroRNA-140 plays dual roles in both cartilage development and homeostasis. *Genes Dev* **24**(11) : 1173-1185, 2010.
- 13) Dudek KA, Lafont JE, Martinez-Sanchez A, et al : Type II collagen expression is regulated by tissue-specific miR-675 in human articular chondrocytes. *J Biol Chem* **285** (32) : 24381-24387, 2010.



続発性骨粗鬆症

～ステロイド性骨粗鬆症と 関節リウマチに伴う骨粗鬆症～

東海大学医学部内科学系リウマチ内科学教授 鈴木 康夫 編

A5判 108頁 定価 3,360円 (本体 3,200円+税5%) 送料実費
ISBN978-4-7532-2337-4 C3047

- ◎年齢、性別を問わず、特定の原因により発症する続発性骨粗鬆症。それによる骨折は、大きな社会問題となっている。
- ◎本書では、その疫学や病態・予防治療に関して、特に新しい知見の多いステロイド性骨粗鬆症と関節リウマチに伴う骨粗鬆症の最新情報をまとめた。
- ◎有効な薬剤が開発されつつある現在、疾患に対する理解と治療にぜひ役立てていただきたい一冊。

株式会社 医薬ジャーナル社 〒541-0047 大阪市中央区淡路町3丁目1番5号・淡路町ビル21 電話 06(6202)7280(代) FAX 06(6202)5295 (振替番号) 00910-1-33353
〒101-0061 東京都千代田区三崎町3丁目3番1号・TKIビル 電話 03(3265)7681(代) FAX 03(3265)8369

<http://www.iyaku-j.com/> 書籍・雑誌/バックナンバー検索, ご注文などはインターネットホームページからが便利です。

Cross-cultural adaptation and validation of the Japanese Knee Injury and Osteoarthritis Outcome Score (KOOS)

Norimasa Nakamura · Ryohei Takeuchi ·
Takeshi Sawaguchi · Hiroyuki Ishikawa ·
Tomoyuki Saito · Sabine Goldhahn

Received: 21 September 2010 / Accepted: 3 June 2011 / Published online: 16 July 2011
© The Japanese Orthopaedic Association 2011

Abstract

Background In Japan, only few cross-culturally adapted, internationally used orthopaedic patient self-assessed outcome scores are available. In addition, the high incidence of knee osteoarthritis (OA) suggests the need for validated outcome measures such as the widely used Knee Injury and Osteoarthritis Outcome Score (KOOS) for Japanese populations. The purpose of this study was to provide a cross-culturally adapted and validated KOOS questionnaire for further use in national and international clinical projects involving Japanese patients.

The Japanese version of the KOOS will be published with a Japanese version of the abstract in the Journal of the Japanese Orthopaedic Association.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00776-011-0112-9) contains supplementary material, which is available to authorized users.

N. Nakamura
Department of Rehabilitation Science, Osaka Health Science
University, 1-9-27 Tenma, Kita-ku, Osaka 530-0043, Japan

R. Takeuchi · H. Ishikawa · T. Saito
Department of Orthopaedic Surgery, Yokohama City University
School of Medicine, 3-9, Fukuura, Kanazawa-ku,
Yokohama 236-0004, Japan

T. Sawaguchi
Department of Orthopaedics and Joint Reconstructive Surgery,
Toyama Municipal Hospital, 2-1, Imaizumi-Hokubu,
Toyama 939-8511, Japan

S. Goldhahn (✉)
AO Clinical Investigation and Documentation,
Stettbachstrasse 6, 8600 Duebendorf, Switzerland
e-mail: sabine.goldhahn@aofoundation.org

Methods The Japanese KOOS was developed according to the standard cross-cultural adaptation guidelines. For validation, the KOOS was tested on 58 patients diagnosed with OA. Reliability was tested using the intraclass correlation coefficient (ICC). Internal consistency or homogeneity was assessed using Cronbach's alpha. Construct validity was evaluated by quantifying the correlation between the KOOS and the Japanese OKS and SF-36 questionnaires with Spearman's correlation coefficients.

Results No major difficulties were encountered during the translation and pre-testing stages. All five KOOS subscales showed adequate reproducibility with ICC values greater than 0.85, high internal consistency with Cronbach's alpha values around 0.90, and high Spearman's coefficients over 0.50 signifying good correlation between the KOOS subscales and the OKS as well as the majority of the established subscales of the SF-36. No floor and ceiling effects were observed for the five subscales.

Conclusions Our validated Japanese KOOS is a reliable and stable outcomes measure that provides a valuable basis for national and international clinical projects focusing on patient-based assessments in knee OA.

Introduction

The goal of clinical treatment is to improve the health condition of the patient. This has especially been recognized over the past 2 decades by the increased availability of literature concerned with creating and validating patient self-assessed outcome measurements such as health-related quality of life (HRQoL) questionnaires or disease-specific function measures. In order to apply these survey measures to patient populations from different countries, the linguistic, behavioural and cultural peculiarities have to be

respected; this demands a careful process of cross-cultural adaptation according to published guidelines [1, 2].

Although Japanese is the first language of around 130 million people worldwide and the incidence of knee complaints such as osteoarthritis (OA) is higher in Japan than in any other country [3, 4], very few efforts have been made to cross-culturally adapt internationally used orthopaedic patient self-assessed outcome scores into Japanese. For the knee, there is no validated Japanese version that has been published except for the Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Index (WOMAC) that also assesses OA of the hip [5]. Consequently, the function and health-related quality of life of Japanese knee patients are often subjectively assessed by the treating orthopaedic surgeon or determined using the Japanese Knee Osteoarthritis Measure [6], which is solely used in Japan.

To integrate Japanese knee patient self-assessments into international clinical projects and facilitate comparisons of treatment results, cross-cultural adaptation of the widely used Knee Injury and Osteoarthritis Outcome Score (KOOS) was the primary goal of this study.

Materials and methods

Cross-cultural adaptation

The cross-cultural adaptation of the KOOS into Japanese was performed according to published guidelines [1, 2]. Briefly, the English version of the KOOS was separately translated by three native Japanese bilingual translators (two with medical backgrounds and one linguist). After uniform agreement was reached among the three forward translators, a common Japanese translation was available. This version was back-translated by two bilingual non-medical, professional translators with the source language as their mother tongue, who were blinded to the original English version. A pre-final consensus version that required only minor amendments was reached by the collective of health and language professionals, and forward and back translators. This version was sent to and approved by the inventor of the KOOS, and then tested for comprehensibility in 51 subjects aged between 18 and 85 years (Supplementary Material, Japanese KOOS).

Validation study

Patients and data collection

Patients were eligible for recruitment at the outpatient departments of two Japanese orthopaedic hospitals if they were diagnosed with knee OA and provided informed consent to participate in this study. Fifty-eight patients

(87.9% women) with a mean age of 68.9 ± 9.4 years were included in our series. Knee OA was graded according to the Kellgren-Lawrence classification [7]: 16 cases had grade 1 OA (27.59%), 16 had grade 2 OA (27.59%), 15 had Grade 3 OA (25.86%) and 11 had grade 4 OA (18.97%).

Each patient received a set of questionnaires for immediate completion during their medical examination. For reliability testing, patients from the first hospital received the series of questionnaires again at a second follow-up consultation, which occurred 7 days after the first appointment. For patients from the second hospital, the set of questionnaires was mailed to them a couple of days later; they were instructed to complete the surveys again at home 7 days after the initial consultation and return them.

Instruments

The KOOS (<http://www.koos.nu/>) is a 42-item joint-specific measure that was developed to assess short- and long-term outcomes in patients with knee injuries, as they are often at risk of developing knee OA [8]. It consists of five subscales that are scored separately from 0 (extreme problems) to 100 (no problems): pain, symptoms, activities of daily living (ADL); sport and recreation function, and knee-related quality of life. This instrument was developed as an extension of the WOMAC [9, 10] and includes the WOMAC in its original form plus additional items [8] considered in the pain subsection. Thus, the WOMAC can be separately calculated from the KOOS. After its initial validation in Swedish with subjects undergoing knee arthroscopy and in American English with subjects undergoing surgical reconstruction of the anterior cruciate ligament, the KOOS has been further validated in several other languages [11–16]. This measure has been used for several medical conditions and orthopaedic treatments including OA, total knee replacement for OA [17], drug treatment for OA [18], high tibial osteotomy [19], patellofemoral OA in meniscectomized patients [20] among others.

The Oxford 12-item Knee Score (OKS) consists of 12 items that address the perception of pain and function based on the categories of response of a 5-point Likert scale [21]. Thus, each item is scored from 1 to 5 (i.e. least to most difficult or severe) and combined to produce a single score ranging from 12 (best) to 60 (worst) points. Although it was recommended to score the five answers from 0 to 4 (resulting in a total score of 48 points) [22], the original 1- to 5-point scoring, cross-culturally adapted and validated Japanese version [23], was used for this validation study.

The Short Form-36 (SF-36) Health Survey is the most widely used questionnaire on HRQoL. It measures health on eight multi-item dimensions covering functional status, well-being and overall evaluation of health (i.e. physical functioning, role-physical, bodily pain, general health,

vitality, social functioning, role-emotional, mental health). In this validation study, the SF-36v2 (4-week recall) was used. Patients were asked to rate their responses on a 3-, 5- or 6-point Likert scale. For each dimension, item scores are calculated, summed and transformed to a scale ranging from 9 (worst health) to 100 (best health) [24].

Psychometric characteristics of the Japanese KOOS

The reproducibility (test-retest reliability) of the KOOS was assessed by calculating the Intraclass Correlation Coefficient (ICC). The ICC ranges from 0.00 (no agreement) to 1.00 (perfect agreement) and describes how the same test results are obtained for repeated assessments when no real change is expected for a subject within the assessment period. For each item of the KOOS and for the KOOS subscores, the ICC was calculated between the responses of the first and the second questionnaire (i.e. test and retest). In cases where one or two questionnaire responses were missing, these were replaced by the mean of the completed subscale responses. In cases with three or more missing responses, the subscale was not calculated for the patient.

Internal consistency or homogeneity of the KOOS was assessed using Cronbach's alpha. This estimation can vary between 0.00 (no correlation) and 1.00 (perfect correlation), where a good correlation among the items (between 0.70 and 0.90) indicates strong internal consistency; higher values may demonstrate a redundancy of items [25].

Construct validity measures the extent to which a score measures what it is supposed to measure. Correlations between the translated KOOS and the SF-36, and Japanese OKS were tested using Spearman's correlation coefficient. Since the KOOS was designed to measure physical health, we hypothesized the following four strong convergent correlations of greater than 0.50 between the KOOS subscales and the OKS, and between the KOOS subscales and the physical components of the SF-36, i.e. physical functioning, role-physical and bodily pain. Three hypotheses were generated where we expected weak to moderate correlations of less than or equal to 0.50, indicating divergent validity between all KOOS subscales and SF-36 mental components, i.e. social functioning, role-emotional and mental health [26].

To assess floor and ceiling effects of the Japanese KOOS, the proportion of answer frequencies with the worst (4) and best possible (0) value on the 5-point Likert scale was calculated for each of the 42 survey items as well as for the five subscales with the lowest (i.e. worst) and highest (i.e. best) score. Scores with floor or ceiling effects may not detect improvements or deteriorations in the patients as they are already at the lower or upper end of the scale. When more than 15% of the participants obtained the highest or lowest score, an effect was noted [27].

Statistical analysis

All analyses were performed using Intercooled Stata version 11 (StataCorp LP, College Station, TX). The scores were reported as mean values \pm standard deviation, and $P \leq 0.05$ was considered significant.

Results

Translation and cross-cultural adaptation

For the cross-culturally adapted KOOS, some Japanese words normally expressed in Kanji—the Chinese characters used in the Japanese writing system—were changed to the Japanese characters of the Kana syllabary Hiragana in order to be more easily read by patients of all education levels. Overall, no major problems were reported from the three forward translators. In the agreement meeting, items S2 (Do you feel grinding, hear clicking or any other type of noise when your knee moves?), S6 (How severe is your knee joint stiffness after first wakening in the morning?) and S7 (How severe is your knee stiffness after sitting, lying, or resting later in the day?) were topics of discussion as no completely identical phrase could be identified in Japanese. For item A10 (Rising from bed), the Japanese Kana for Western style beds were used instead of the Kanji for the typical Japanese futon. Major discussions were raised for item A12 (Lying in bed [turning over, maintaining knee position]) as no Japanese expression could be identified for an appropriate expression of “maintaining knee position”; this part of the question was replaced by the equivalent Japanese translation for “and others”. Item A15 (Getting on/off toilet) was another point of discussion; the expression of “Western style toilet” was used instead of the phrase for typical Japanese toilets. No further issues were observed during the back translation and pretesting phase for comprehensibility of the cross-cultural adaptation.

Reliability and internal consistency

Of the 58 included patients, 53 (91.38%) completed the entire questionnaire at the first and second distribution, respectively. For each of five subjects at the first distribution and four subjects at the second distribution, only one item was missing; for one subject at the second distribution, two answers were missing. For calculation of the five subscores, these missing items were imputed with the mean of the completed subscale response. Two of the respondents had a missing questionnaire item at both test assessments. The mean test-retest data for the five subscales are shown in Table 1. The ICC values were all over 0.85, indicating adequate reproducibility of the KOOS.

Table 1 Reliability data for the five Japanese Knee Injury and Osteoarthritis Outcome Score (KOOS) subscales

| Subscore ^a | Test (T1), n = 58 | | | | Retest (T2), n = 58 | | | | ICC | 95% CI (ICC) | CA |
|-----------------------|-------------------|----------|-------|-------|---------------------|--------|-------|-------|------|--------------|------|
| | Min | Max | Mean | SD | Min | Max | Mean | SD | | | |
| Pain | 19.44 | 100 (3%) | 67.09 | 21.11 | 19.44 | 100.00 | 67.68 | 20.63 | 0.89 | 0.82–0.93 | 0.90 |
| Symptoms | 25.00 | 100 (5%) | 71.38 | 18.97 | 17.86 | 100.00 | 70.81 | 18.29 | 0.88 | 0.80–0.93 | 0.90 |
| ADL | 25.00 | 100 (5%) | 75.84 | 18.91 | 30.89 | 98.53 | 76.00 | 18.78 | 0.88 | 0.80–0.93 | 0.89 |
| Sport/recreation | 0 (10%) | 100 (2%) | 45.91 | 32.95 | 0 | 95.00 | 49.31 | 32.18 | 0.90 | 0.83–0.94 | 0.90 |
| QOL | 0 (2%) | 100 (3%) | 49.35 | 25.77 | 0 | 100.00 | 53.16 | 26.64 | 0.86 | 0.77–0.92 | 0.89 |

Percentages in parentheses represent the proportion of study patients with the lowest or highest possible score for the nominated KOOS subscore, and provide information regarding floor and ceiling effects

SD standard deviation, ICC intraclass correlation coefficient, 95% CI 95% confidence interval, CA Cronbach’s alpha estimation of internal consistency, ADL activities of daily living, QoL quality of life

^a Each subscore contains a number of the 42 KOOS items (see Appendix). The total score of 100 points, best score; 0, worst score

Table 2 Construct validity

| Reference score | Mean score ± SD | KOOS pain | KOOS symptoms | KOOS ADL | KOOS Sport/Rec | KOOS QOL |
|---------------------------|-----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| SF-36 (physical function) | 62.74 ± 21.62 | <i>0.68**</i> | <i>0.71**</i> | <i>0.74**</i> | <i>0.72**</i> | <i>0.60**</i> |
| SF-36 (role–physical) | 60.24 ± 28.79 | <i>0.49**</i> | <i>0.47**</i> | <i>0.62**</i> | <i>0.63**</i> | <i>0.62**</i> |
| SF-36 (bodily pain) | 47.41 ± 21.64 | <i>0.67**</i> | <i>0.61**</i> | <i>0.74**</i> | <i>0.67**</i> | <i>0.67**</i> |
| SF-36 (general health) | 56.81 ± 17.43 | <i>0.35**</i> | <i>0.41**</i> | <i>0.28*</i> | <i>0.31*</i> | 0.21 |
| SF-36 (vitality) | 56.72 ± 19.30 | <i>0.31*</i> | <i>0.30*</i> | <i>0.37**</i> | <i>0.30*</i> | <i>0.31*</i> |
| SF-36 (social function) | 71.77 ± 23.60 | <i>0.33*</i> | <i>0.32*</i> | <i>0.28*</i> | <i>0.28*</i> | <i>0.34**</i> |
| SF-36 (role–emotional) | 64.18 ± 30.50 | <i>0.37**</i> | <i>0.35**</i> | <i>0.59**</i> | <i>0.50**</i> | <i>0.46**</i> |
| SF-36 (mental health) | 64.25 ± 22.40 | <i>0.36**</i> | <i>0.30*</i> | <i>0.31*</i> | <i>0.34*</i> | <i>0.34*</i> |
| Oxford Knee Score | 27.24 ± 9.69 | <i>–0.80**</i> | <i>–0.78**</i> | <i>–0.85**</i> | <i>–0.79**</i> | <i>–0.74**</i> |

Spearman’s correlation coefficients (r_s) when comparing the five KOOS subscales to the SF-36 and Oxford Knee Score

Italicized numbers indicate that a priori hypotheses were supported

SF-36 Short Form-36 Health Survey, SD standard deviation, ADL activities of daily living, Sport/Rec sport/recreation, QOL quality of life

* Significant correlation at the 0.05 level (2-tailed)

** Significant correlation at the 0.01 level (2-tailed)

Cronbach’s alpha for the individual questionnaire subscales ranged from 0.89 to 0.90, which suggests a high level of internal consistency.

Based on the individual questionnaire items, item P8 (What amount of pain have you experienced the last week during sitting or lying?) showed the lowest reliability with an ICC value of 0.45 (95% CI 0.21–0.63); the highest ICC value of 0.90 was calculated for item P3, i.e. Straightening the knee fully (Appendix).

Validity

As hypothesized, there were strong correlations when comparing all KOOS subscales with the OKS and the SF-36 physical function, role-physical and bodily pain score elements except for KOOS pain and symptoms versus the SF-36 role-physical subscore ($r_s = 0.49$ and 0.47 , respectively, $P < 0.01$) (Table 2). Hypothesized divergent

construct validity (none to weak/moderate correlation) was found between all KOOS subscales and the mental component equivalents of the SF-36 (i.e. social function, role-emotional, mental health) except for the KOOS ADL and sport/recreation subscales versus the SF-36 role-emotional component (i.e. higher than expected correlations of 0.59 and 0.50 were calculated, respectively). The remaining two SF-36 elements, which assess general health and vitality, also showed no, weak or only moderate correlations with all five KOOS subscales (Table 2).

Floor and ceiling effects

Generally, there were no considerable floor or ceiling effects for the five KOOS subscales (Table 1). For 12 of the individual KOOS items (Appendix), a floor effect was observed with 38, 32 and 31% of the patients reporting the worst score for items Q1 (How often are you aware of your

knee problems?), SP3 (Jumping) and P1 (How often do you experience knee pain?), respectively. Considerable ceiling effects in the single items were observed for all items except items S7 (How severe is your knee stiffness after sitting, lying or resting later in the day?), P1 (How often do you experience knee pain?), P2 (Twisting/pivoting on your knee), SP2 (Running), SP3 (Jumping), Q1 (How often are you aware of your knee problem?), Q3 (How much are you troubled with lack of confidence in your knee?) and Q4 (In general, how much difficulty do you have with your knee?) (Appendix). The highest ceiling effect was found for items A14 (Sitting) and A15 (Getting on/off toilet), with 81 and 76% of the patients reporting no difficulties for the respective activities.

Discussion

Compared to other populations, the number of patients with knee OA is remarkably high in Japan, leading to a major impact on the public health care system. Among the diseases requiring support in ADL, knee OA is ranked as second by the National Livelihood Survey of the Ministry of Health, Labour and Welfare in Japan [4, 28]. In conjunction with an aging society, there is a strong need for measurement tools to assess the impact of knee OA—related to a former knee injury or not—on the life of the patient, and evaluate the outcome from the patient's perspective after specific treatments. Due to the continuing lack of available Japanese patient self-assessment tools for evaluating knee complaints, the goal of this study was to cross-culturally adapt and validate one of the most widely used patient self-rating knee outcome instruments, the KOOS. The Japanese KOOS showed comparable reliability, internal consistency and construct validity to that of the original KOOS as well as other language versions [8, 12–16].

With respect to the peculiarities of the Japanese language, where the same words can be expressed using three different types of writing and the same syllables can be expressed with different Kanji characters, it was agreed that three instead of the officially recommended two forward translators should translate the 42 questionnaire items. Although there were some discussions in the agreement meeting between the three forward translators regarding certain phrases, these difficulties were resolved, and the overall results for reliability and validity indicate the satisfactory ability of the translated questionnaire to assess patient-rated outcomes associated with knee injury and OA.

As reported for the original KOOS and the German, Dutch, Portuguese, Persian, French, Singapore English and Chinese versions, good correlations for all five subscales and single items indicating good stability of the instrument

were also found for the Japanese KOOS. Only for item P8 (What amount of pain have you experienced the last week during sitting or lying?), the ICC value of 0.45 was the lowest calculated correlation of all the 42 individual items. One reason could be that pain is a very subjective perception that can vary even within a 7-day interval and can also depend on several factors such as the level of depression [29], the circadian rhythm [30] of an individual as well as others. Nevertheless, this explanation may not unequivocally explain our finding of a low correlation for pain experienced exclusively while sitting or lying.

Internal consistency was strong and not higher than 0.90 for all five subscales of our KOOS version, indicating that there is no redundancy in the items of the Japanese KOOS when used in patients with knee OA. In contrast to our results, higher CA values (>0.90) were reported for the ADL subscale of the KOOS in Persian, Portuguese, Dutch, French and Singapore English [11–13, 15, 16], and for the sports/recreation subscales of the Portuguese and Dutch versions [11, 15], suggesting that there may be some redundancy in the related questions of the original KOOS construct itself. A direct comparison of internal consistency with the English KOOS version is not possible because CA values were not reported in the original publication [8].

Although ceiling effects were observed for the majority of single items with few individual floor effects, this had no notable consequence on the relation of minimum and maximum scores of the five subscales. Age and gender factors of our study population are comparable to the Portuguese, French, Swedish and the Singapore English and Chinese versions, but not to the Persian series, which included younger patients with a larger proportion of males. A possible reason for the ceiling effects in the single items of our sample could be the influence of patients with mild (grade 1) OA (28%), who are likely to have fewer complaints compared to those with more severe forms of the disease. This conforms to the findings of the Dutch validation study [15], which also included patients with mild OA; ceiling effects had such a notable influence on three (pain, symptoms and ADL) of the five subscales. The floor effects for all items of the sports/recreation and three items of the QoL subscales in our sample are most likely due to the inclusion of cases with more severe OA who were no longer able to participate in sporting activities. Despite the reported floor effects for all single items in the sports/recreation subscale, their influence was not as pronounced on the overall sports/recreation subscale itself. Much higher floor effects in this subscale are reported from the Singapore English and Chinese versions [13]. Severe OA cases included in the Dutch questionnaire had a strong influence to the extent that floor effects of 38 and 15% were observed for the sport/recreation and QoL subscales, respectively.