

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 24 日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791572

研究課題名(和文) 関節軟骨におけるストレス応答分子の検索と炎症・基質破壊経路との関連性に関する検討

研究課題名(英文) Identification of effector molecules for cellular stress and related molecular signaling pathways in chondrocyte

研究代表者

小野寺 勇太 (ONODERA, Yuta)

近畿大学・医学部附属病院・助手

研究者番号：30510911

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：高齢化社会の到来に伴い、変形性膝関節症などの関節疾患の有病率が増加している。関節疾患では様々な要因により自己再生能力に乏しい関節軟骨の損傷や滑膜組織の炎症により、歩行時や加重時に疼痛を伴い、高齢者は特にその傾向が顕著で生活におけるQOLを著しく低下させる要因となっている。そこで物理的ストレスによってもたらされる活性酸素に着目し、軟骨組織の恒常性維持に関わる滑膜組織で活性酸素の発生に伴い活性化されるTAK1を見出した。TAK1を抑制することで痛みの原因を効率良く抑制することが可能であった。また、軟骨細胞の恒常性維持に抗酸化マスター因子のNrf2が重要な役割を果たしていることも見出した。

研究成果の概要(英文)：My purpose of this study is to declare the molecular mechanism of catabolic action in chondrocytes/synovial cells and relationship with some stress factors. We demonstrated here that 1) Rho-ROCK signaling cascade could be a primary molecules response to mechanical stress and lead to downstream catabolic actions, 2) in the synovial cells, TAK1 is an effector molecule in the ROS-induced Cox-2 expression, and 3) hyaluronic acid (HA), which is a well known pharmacological molecules for osteoarthritis, could reduce cellular superoxide generation and accumulation via induction of overexpression of Nuclear factor-erythroid-2-related factor 2 (Nrf2), which is a master transcription factor in cellular redox reactions, in cultured chondrocyte derived from bovine joint cartilage. These studies suggest some novel mechanisms relate to responsible molecules in the stress response and activation of catabolic reactions, and its pharmacological moderator.

研究分野：再生医療

キーワード：変形性膝関節症 炎症 Nrf2 TAK1 ROS ヒアルロン酸

## 1. 研究開始当初の背景

超高齢社会の到来に伴い、変形性関節症(OA)などの関節疾患の有病率が増加している。OAでは様々な要因により関節軟骨が損傷し、歩行時や加重時に疼痛を伴うことから、高齢者の生活におけるQOL(生活の質)を著しく低下させる要因となっている。

軟骨組織は自己再生能力に乏しいため一度損傷すると自発的な再生、回復を望みにくく、高齢者においては特にその傾向が顕著である。高度に進行した関節軟骨の破壊に対しては人工関節への置換、あるいは近年では自家軟骨を用いた再生医療の適応がありうるが、疼痛が弱い症例や軽度の損傷に対しては疼痛・炎症の除去あるいはリハビリテーションにより膝関節を安定させるという対症的療法が選択されている。しかし、基質破壊が開始している軟骨組織においては潤滑性、緩衝性の減少に伴い軟骨細胞が大きな機械的ストレスを受け、摩耗が進行し痛みが増強する可能性がある。あるいは、再生医療が適応された場合においても、再生途上にある未熟な軟骨が荷重ストレスに曝されることで細胞の脱分化や線維化、最終的には脱落といった軟骨再生の阻害へと導かれるおそれがある。

これまでに、軟骨組織に対する物理的ストレスの負荷が軟骨細胞における活性酸素種(ROS)の発生を誘引し、組織の変性を加速度的に進行させることが報告されている。しかし、ROSの発生をもたらした細胞内分子メカニズムは依然不明であり、ROSが軟骨細胞におよぼす影響についても未知の点が多い。また、物理的(圧迫)ストレスに対し一次的に应答するシグナル分子については全く未知である。軟骨細胞における物理的ストレス应答機構および炎症・破壊カスケードの詳細な解明は、関節軟骨の破壊進行メカニズムの理解に必須であり、また、これに対する薬剤の開発に欠かすことができない。

## 2. 研究の目的

超高齢社会の到来に伴い、OAを始めとした関節疾患の有病率が著しく増加している。軟骨組織は自己再生能力に乏しいため一度損傷すると自発的な再生、回復を望みにくく、

高齢者においては特にその傾向が顕著である。軟骨基質の破壊が開始している軟骨組織においては潤滑性、緩衝性の減少に伴い軟骨細胞が大きな機械的ストレスを受け、摩耗が進行し痛みが増強する可能性がある。軟骨組織に対する物理的ストレスの負荷は軟骨細胞におけるROSの発生を誘引し、組織の変性を加速度的に進行させる。しかしROSの発生をもたらす細胞内分子メカニズムは依然不明であり、ROSが軟骨細胞におよぼす影響についても未知の点が多い。また、物理的(圧迫)ストレスに対し一次的に应答するシグナル分子については全く未知である。本研究では、関節軟骨の破壊進行メカニズムの理解を目的に、軟骨細胞における物理的ストレス应答機構および炎症・破壊カスケードの詳細な解明を目指した研究を行う。

## 3. 研究の方法

本研究では関節軟骨に実際に荷重ストレスを与え、これに应答する分子を検索した。ヒトでは正常関節軟骨組織を入手することは不可能であるため、ウシMP関節軟骨およびウシ滑膜をモデルとする。また、分子メカニズムの詳細な検討には、客観性と再現性を重視するためヒト軟骨/滑膜細胞、ウシ軟骨/滑膜細胞、マウス軟骨前駆細胞株ATDC5など培養細胞レベルでの実験を行う。

1: 軟骨組織(モデル)に対する荷重の負荷とストレス应答物質の探索

2: 炎症・基質破壊カスケードとの関連性に関する研究

についての研究を行い、1においてはストレスの1次的な应答分子を検索、特定までを行う。2においては、1で得られた分子と、既知の軟骨組織炎症・破壊物質との関連性について検討した。上記分子の活性化モデルを培養細胞レベルで再現し、イムノプロットやRealtime-PCR、免疫染色などを用いて動物種を越えたカスケードの特定までを試みる。

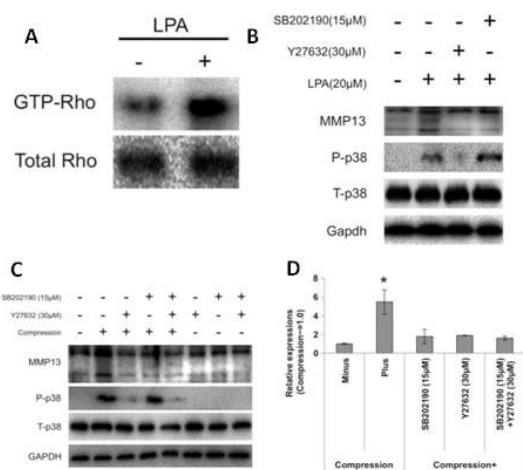
## 4. 研究成果

本実験では、当研究室において過去に得られた知見および今回新たに実施したウシMP軟骨組織および周期的圧迫ストレス負荷

(FX-4000 Flexercell Compression Plus)を用いた Ex vivo の実験系により低分子量 G タンパク質の 1 つである活性型 Rho-GTP と活性酸素種(ROS)を検出した。これらの因子が炎症・基質破壊カスケードを惹起し軟骨組織の破壊および滑膜組織の炎症・肥大の原因因子となり、症状緩和のターゲットとして有効であるのかそれぞれ検証した。

まず、活性型の Rho-GTP について詳細な解析を行った。ウシ MP 軟骨組織および周期的圧迫ストレス負荷により、活性型 Rho-GTP の上昇を認め、さらには炎症マーカーである p38 の活性化や軟骨基質破壊マーカーである MMP-13 の発現亢進が明らかとなった。また、Rho の活性化を誘導するリゾフォスファチジン酸(LPA)を用いてウシ軟骨細胞を刺激したところ Rho の活性化および p38、MMP-13 の亢進が再現された。これより、Rho の活性化は軟骨組織・細胞にとってカタボリックな因子であることが示唆され、Rho-GTP を起点とするカスケードの抑制を試みた。Rho-GTP の下流に位置する ROCK の阻害剤として Y-27632 が知られている。周期的負荷または LPA 添加区に Y-27632 または p38 阻害剤の添加を行ったところ p38 および MMP-13 の活性化は有意に抑制されることが明らかとなった(図 1)。

図 1 : 活性型 Rho の抑制による軟骨基質破壊の抑制

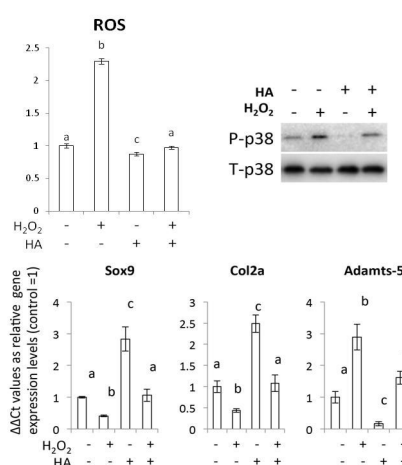


次に、Rho と並行して亢進していた ROS について解析を行った。ROS 除去のマスター転写因子として NF-E2-related factor 2 (Nrf2) が知られており、ARE/EpRE ドメインに結合することでグルタチオン合成酵

素やヘムオキシゲナーゼ 1 など抗酸化に関わる酵素類を制御している。また、ROS センサーおよび Nrf2 タンパク質分解のアダプターとして Keap1 が知られている。Keap1 は Nrf2 に結合し転写を制御しており、活性酸素種などのストレス因子により Keap1 がリン酸化されると Nrf2 から乖離し抗酸化因子の転写が活性化される。そこで、本研究では無血管である軟骨組織・細胞下においても Nrf2-Keap1 が重要な役割を担っていると考え、培養軟骨においてその重要性を検証した。さらに、臨床でも抗酸化剤・軟骨保護剤などといった観点で長年利用されてきたヒアルロン酸製剤(HA)が Nrf2 を活性化し、軟骨にとって抗酸化効果を発揮しうるのか検討した。

屠場より譲渡されたウシ軟骨組織より軟骨細胞を樹立し以下の実験に用いた。軟骨細胞に活性酸素(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)を添加すると有意に細胞内 ROS は上昇し、炎症マーカーである p38 は活性化された。一方、軟骨細胞特異的な Sox9、Col2a1 は H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の添加と共に遺伝子発現が減少し、軟骨基質破壊マーカーである Adamts-5 は亢進していることが分かった。しかし、HA を添加することで細胞内 ROS は抑制され、前述した遺伝子発現は回復することも明らかとなった(図 2)。

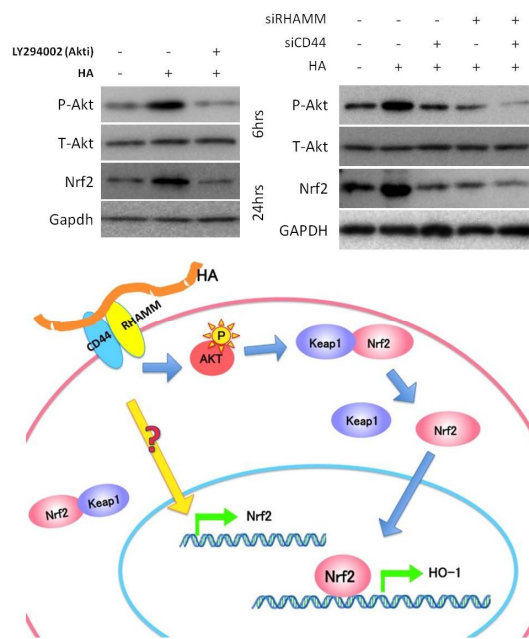
図 2 : 軟骨における ROS と HA の効果



さらに、siRNA によって Nrf2 をノックダウンすると ROS の亢進と同時に軟骨破壊が進行した。また、HA は CD44 / RHAMM といったヒアルロン酸レセプターに結合し、Akt の活性化を通して Nrf2 の核内移行を促進し

ていることが示唆された(図 3)。

図 3 : 軟骨細胞における HA の抗酸化メカニズム



最後に、軟骨組織を取り巻く滑膜組織についても ROS の影響を検討した。滑膜組織は無血管である軟骨組織に対し関節液を介してサイトカインやアミノ酸など栄養源を供給し、老廃物の除去といった恒常性の維持に大きく寄与している。一方、滑膜組織は OA や関節リウマチ(RA)において、過度の肥大を認め、IL-1 や TNF- $\alpha$  などの炎症性サイトカインや ROS といった炎症性メディエーターを分泌することが知られ、疼痛因子である PGE2 などの産生の際としても知られている。ストレス環境下における軟骨組織を包括的に理解するには滑膜組織に対するアプローチは必須と考えた。

軟骨組織・細胞同様に、屠場より譲渡されたウシの四肢より滑膜組織を回収し、酵素処理により滑膜細胞を樹立した。樹立した滑膜細胞に対し、過酸化水素処理を行ったところ濃度依存的に細胞内 ROS の亢進が認められ、同時に疼痛マーカーである PGE2 の亢進も認められた。また、炎症マーカーとして MAPK(p38 / JNK / Erk)および NF- $\kappa$ B(I $\kappa$ B)の発現を確認したところ何れも活性化されており、それぞれの阻害剤を添加すると、p38・Erk・NF- $\kappa$ B の阻害剤で PGE2 の産生を抑制することも可能であった。なお、JNK の阻害剤は効果が得られなかった(図 4)。

図 4 : 滑膜細胞における PGE2 をモニターとした ROS と MAPK / NF- $\kappa$ B の関係

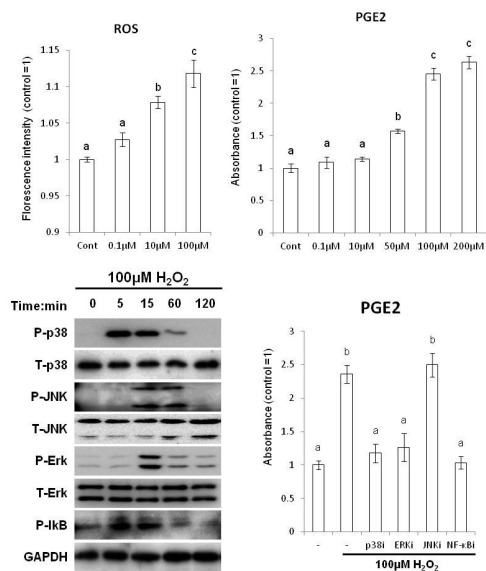
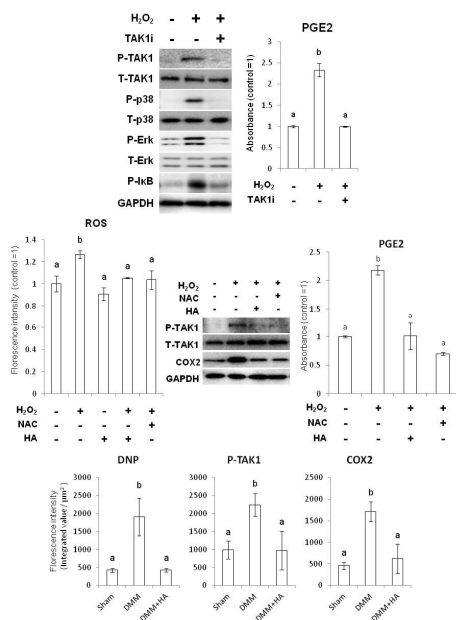


図 4 までの結果を踏まえて、p38・Erk・NF- $\kappa$ B に共通した上流因子を探索した結果、MAPKKK の 1 つである TAK1 が候補として抽出された。TAK1 は IL-1 や TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$  といったサイトカインで活性化されることが知られている。そこで、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 添加によっても TAK1 を始めとした下流のシグナル及び PGE2 が活性化しうるか検討した。その結果、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の添加により TAK1 が活性化されることが明らかとなった。また、TAK1 の阻害剤である 5Z-7-oxozeaenol を添加したところ TAK1 および p38・Erk・NF- $\kappa$ B も抑制され、PGE2 の発現も抑制された。さらに、抗酸化剤である HA を用いて TAK1 の抑制を試みたところ ROS の低下と共に TAK1 以下のシグナルも抑制することが示された。マウスを用いて OA モデルを作成し、In vivo でも同様の結果が得られるか、組織切片を作成し免疫組織染色の結果を定量して検討した。OA モデルマウスは明らかな滑膜肥大を認め、ROS を標識したマーカーである DNP が有意に高いことが分かった。さらには、HA の関節内投与によって ROS および TAK1 の活性化、PGE2 合成酵素の COX-2 が抑制されていることが示された(図 5)。

**図5：TAK1 をターゲットにした滑膜細胞と OA モデルマウスにおける HA による ROS 由来炎症抑制効果**



以上のことから、ヒト関節疾患のモデルとして数多く報告のあるウシ軟骨組織・滑膜組織を利用し、Ex vivo などの実験系から Rho や ROS といったストレス因子が抽出された。これらのストレス因子は軟骨変性を亢進させることが示され、また、既に臨床応用されているものの詳細な抗酸化メカニズムが明らかとされていなかった HA についても、軟骨細胞および滑膜細胞それぞれで抗酸化効果を確認し示すことができた。これらの結果は、「Hyaluronic acid regulates a key redox control factor Nrf2 via phosphorylation of Akt in bovine articular chondrocytes」と「Reactive oxygen species induce Cox-2 expression via TAK1 activation in synovial fibroblast cells」として海外誌(査読有)に投稿し、Minor Revision として対応中である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

Takehara T, Teramura T, Onodera Y, Fukuda K. Establishment and Culture of Rabbit Embryonic Stem Cells. 日本受精着床学会雑誌 2014. 31(2) : 236-241. 査読有  
Onodera Y, Teramura T, Takehara T,

Fukuda K. c-Jun N-terminal kinase (JNK) mediates Rho/ROCK induced Sox9 diminution in chondrocytes. Acta Medica Kinki University 巻 38 No.2 2013 査読有

Teramura T, Sugimoto H, Frampton J, Kida Y, Nakano M, Kawakami M, Izumi H, Fukunaga N, Onodera Y, Takehara T, Fukuda K, Hosoi Y. Generation of Embryonic Stem Cell Lines from Immature Rabbit Ovarian Follicles. Stem Cells Dev. 2013 Mar 15;22(6):928-38. 査読有

DOI: 10.1089/scd.2012.0300.

Teramura T, Onodera Y, Takehara T, Frampton J, Matsuoka T, Ito S, Nakagawa K, Miki Y, Hosoi Y, Hamanishi C, and Fukuda K. Induction of Functional Mesenchymal Stem Cells in Severe Hypoxic Condition from Rabbit Embryonic Stem Cells. Cell Transplantation. 2013. 22(2):309-29.. 査読有

DOI: 10.3727/096368912X653291.

Nakagawa K, Teramura T, Takehara T, Onodera Y, Hamanishi C, Akagi M, Fukuda K. Cyclic compression-induced p38 activation and subsequent MMP13 expression requires Rho/ROCK activity in bovine cartilage explants. Inflamm Res. 2012. Oct;61(10):1093-100. 査読有  
DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.12.052.

〔学会発表〕(計 9 件)

第 14 回日本再生医療学会、「炎症時に低下する滑膜細胞のサイトカイン産生能と初期ストレス応答因子の抑制効果」小野寺勇太、寺村岳士、竹原俊幸、福田寛二 2015 年 3 月 19-21 日 パシフィコ横浜、神奈川

第 28 回日本軟骨代謝学会、「ヒアルロン酸は Nrf2 を活性化することで細胞内 ROS を抑制する」小野寺勇太、寺村岳士、竹原俊幸、福田寛二 2015 年 3 月 6-7 日 東京医科大学、東京

第 29 回日本整形外科学会基礎学術集会、  
「ヒアルロン酸は滑膜細胞における酸化  
ストレス誘導性の COX2 産生を抑制す  
る」 小野寺勇太、寺村岳士、竹原俊幸、  
福田寛二 2014 年 10 月 9-10 日 城山観  
光ホテル、鹿児島

第 35 回日本炎症・再生医学会、「ウシ軟  
骨細胞における TAK1 を介した HIF-2 に  
よる軟骨破壊のメカニズムの解明」小野  
寺勇太、寺村岳士、竹原俊幸、福田寛二  
2014 年 7 月 1-4 日 万国津梁館、沖縄

第 13 回日本再生医療学会、「マウス軟骨  
前駆細胞 ATDC5 における Rho/ROCK を  
介した JNK による Sox9 遺伝子の発現の  
制御」 小野寺勇太、寺村岳士、竹原俊  
幸、福田寛二 2014 年 3 月 4-6 日 国立  
京都国際会館、京都

第 27 回日本軟骨代謝学会、「ヒアルロン  
酸は滑膜細胞における酸化ストレス誘導  
性の Cox2 酸性を抑制する」小野寺勇太、  
寺村岳士、竹原俊幸、福田寛二 2014 年  
2 月 28 日-3 月 1 日、京都府医師会館、京  
都

第 28 回日本整形外科学会基礎学術集会、  
「低酸素培養によるヒト iPS 細胞からの  
間葉系幹細胞の分化誘導」 小野寺勇太、  
寺村岳士、竹原俊幸、福田寛二 2013 年  
10 月 17-18 日、幕張メッセ、千葉

第 12 回日本再生医療学会、「間葉系幹細  
胞(MSC)シートによるラット関節軟骨全  
層欠損の軟骨再生」小野寺勇太、寺村岳  
士、竹原俊幸、福田寛二 2013 年 3 月  
21-23 日 パシフィコ横浜、神奈川

第 27 回日本整形外科学会基礎学術集会、  
「メカニカルストレスは Rho/ROCK の  
活性化を介してヒト iPS 細胞の未分化性  
制御に關与する」小野寺勇太、寺村岳士、  
竹原俊幸、中川晃一、赤木將男、福田寛  
二 2013 年 3 月 25-26 日 名古屋国際会  
議場、愛知

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

名称：間葉系細胞または軟骨細胞の製法なら  
びに発癌性の抑制方法

発明者：寺村岳士，福田寛二，小野寺勇太

権利者：学校法人近畿大学

種類：特許

番号：特許第 5636174 号

出願年月日：平成 21 年 7 月 10 日

取得年月日：平成 26 年 10 月 24 日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

近畿大学 高度先端総合医療センター 再生  
医療部

<http://www.med.kindai.ac.jp/stemcell/>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

近畿大学・医学部附属病院・助手

小野寺 勇太 (ONODERA YUTA)

研究者番号：30510911