

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06169

研究課題名(和文)変形性関節症治療への応用を目指したS100a1の関節軟骨保護作用の検討

研究課題名(英文) Analysis of the protective effect of S100a1 against joint degeneration to develop a new treatment for osteoarthritis

研究代表者

森 芳史 (Mori, Yoshifumi)

東京大学・医学部附属病院・登録研究員

研究者番号：60757954

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：以前に行っていた研究で、S100a1のノックアウト(KO)マウスでは野生型マウスに比して変形性関節症が有意に悪化する事が判明していた。本研究では、S100a1 KOマウスと野生型マウスの関節軟骨に対して網羅的遺伝子発現解析を行い、S100a1 KOマウスの関節軟骨ではanabolicな因子の発現が低下している事を見出した。続いて行ったin vitro研究によって、S100a1は軟骨細胞のanabolismを正に制御している事が判明した。また、S100タンパクには細胞外作用と細胞内作用があるが、S100a1のpro-anabolicな作用は後者を介している事を示唆する実験結果が得られた。

研究成果の概要(英文)：In our previous study, we found that S100a1 knockout (KO) mice showed greater progression of osteoarthritis than wild-type (WT) mice. In this study, we performed a global gene expression analysis of articular cartilages from S100a1 KO and WT mice, which revealed that the expression of anabolic factors was downregulated in the articular cartilages of the S100a1 KO mice. In subsequent in vitro experiments, we found that S100a1 positively regulated the anabolism of chondrocytes. S100 family proteins have two functions, namely extracellular and intracellular functions. The results of this study suggest that the pro-anabolic effect of S100a1 might be mediated by the latter.

研究分野：軟骨代謝

キーワード：変形性関節症 S100

### 1. 研究開始当初の背景

変形性関節症(Osteoarthritis, OA)等の関節変性疾患は高齢者における有病率が非常に高く、ADLを低下させ、さらにADL低下に伴う多様な内科的合併症をもたらす。従って関節変性疾患による医療・社会的コストは甚大であり、早急かつ強力な医学界の対応が求められている。しかし、OAに対する根治療法は存在せず、鎮痛剤や関節内注射、更には人工関節手術など、姑息的あるいは侵襲的な治療に頼るしかないのが現状である。変形性関節症に対する有効な治療法が存在しない原因として、軟骨細胞の病的状態に関与する分子メカニズムについて未解明の部分が多い事が挙げられる。分子生物学的根拠に基づいたOAの有効な治療法を確立するためには、OA病態の進展、あるいはOAに対する防御機構にどのような分子や代謝パスウェイが関与しているかを解明し、それに基づいて治療戦略を立てる必要がある。今回の研究は、研究代表者らがこれまでの研究でOA病態に対する防御機構に関与している可能性を見出している分子である、S100A1を対象として行った。

### 2. 研究の目的

(1) S100ファミリータンパクは低分子の調節タンパクであり、多数のsubtypeがある。S100タンパクは2量体を構成して様々な標的タンパクと結合し、リン酸化の抑制、酵素活性の調節、転写因子の活性の調節、及び細胞周期の制御等の、多彩な生理的作用を發揮する(図1、引用文献)。

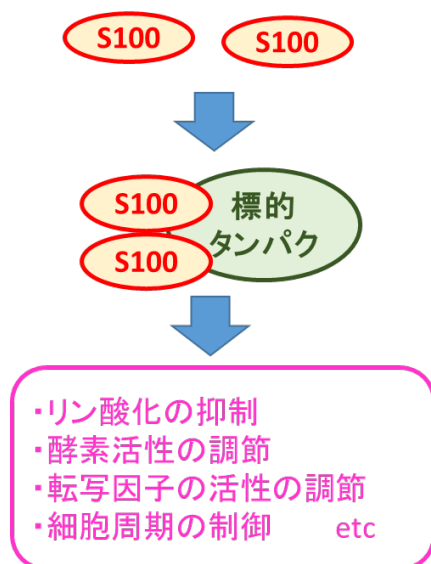


図1 S100タンパクの機能

(2) S100タンパクの軟骨組織における機能については、S100A4、S100A8、S100A9、S100A11、及びS100A12等が炎症誘発作用を介して軟骨変性を促進する事がこれまでに報告されている。一方、軟骨変性に対する防御作用を有するsubtypeは知られていない(引用文献

~)。

以前の研究で我々は、S100ファミリーのうちのS100A1とS100Bが、in vitroで、軟骨細胞の肥大分化を抑制する作用を持つ事を発見した(引用文献)。しかし、続いて行ったS100a1・S100bダブルノックアウトマウスのin vivo解析では、骨格系や関節軟骨の形成に関しては異常を見いだせなかった(図2、引用文献)。

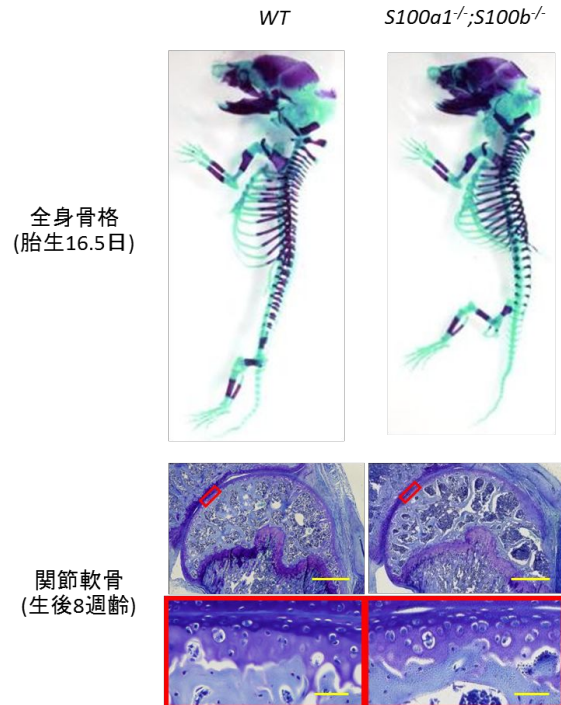


図2 S100a1・S100bダブルノックアウトマウスの骨格系・関節軟骨の形成

しかしながら、in vivoで変形性関節症進行へのS100A1とS100Bの寄与に関して検討を行った所、S100A1とS100Bのうち、S100A1が変形性関節症に対して抑制的に作用している可能性を見出した。この結果から推定されるS100A1の関節保護作用について詳細に検討し、将来的な臨床応用に繋がりうる知見を得る事を目的として、本研究を行った。

### 3. 研究の方法

(1) 野生型及びS100a1ノックアウトマウスの膝関節を採取し、RNAを抽出し、マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を行った。

(2) 軟骨変性時のS100a1の発現解析を行った。野生型マウスに対して外科的誘導変形性膝関節症モデルを導入し、術後経時的に膝関節を採取した(引用文献)。EDTAによる脱灰を行った後、抗S100A1抗体及びIgGによる免疫染色を行った。

(3) マウス関節軟骨細胞にS100a1に対するsiRNAを投与し、リアルタイムRT-PCRにより遺伝子発現変化を評価した。

(4) マウス関節軟骨細胞に対し、GFP 及び S100A1 を過剰発現させるアデノウイルス (Ax-GFP, Ax-S100A1) を投与した。mRNA 発現変化をリアルタイム RT-PCR で、タンパク発現変化をウェスタンブロットで、基質産生を dye-binding アッセイでそれぞれ評価した。

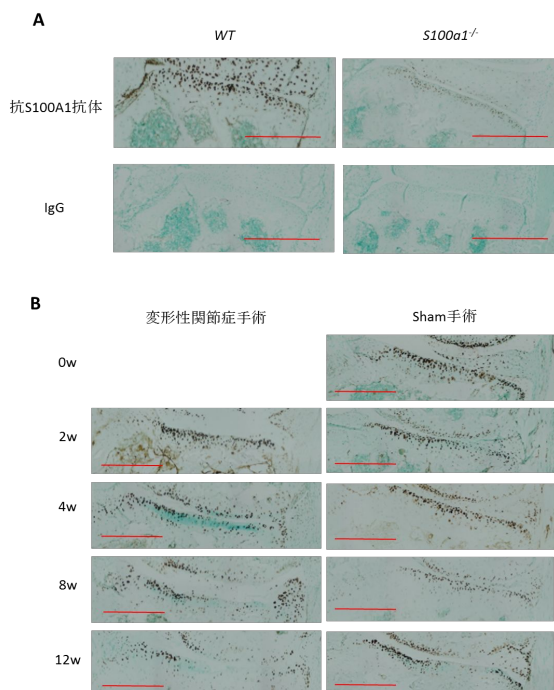
(5) マウス関節軟骨細胞に対し、ヒトリコンピナント S100A1 タンパク (rhS100A1) を投与し、リアルタイム RT-PCR により遺伝子発現変化を評価した。

#### 4. 研究成果

(1) 網羅的遺伝子発現解析の結果、S100a1 ノックアウトマウスの膝関節では、野生型に比して関節軟骨の anabolism を司る遺伝子の発現が低下している事が判明した。

(2) まず、野生型及び S100a1 ノックアウトの 8 週齢マウスの膝関節について、抗 S100A1 抗体を用いて組織免疫染色を行った (図 3 A)。抗 S100A1 抗体による染色は S100a1 ノックアウトマウスでは野生型に比して極めて弱く、解析に用いた抗 S100A1 抗体が S100A1 に特異的であると判断した。野生型では、関節軟骨全層・全横位で染色が見られ、正常な関節軟骨では S100A1 はコピキタスに発現していると考えられた。

次いで、野生型マウスの、変形性関節症誘導手術又は sham 手術を行った膝の継時的サンプルに対して同じく抗 S100A1 抗体を用いて組織免疫染色を行った (図 3 B)。変形性関節症手術群では、本手術で変性が誘導される荷重部の軟骨細胞で、継時的に S100A1 の染色性が低下していた。この事から、S100A1 の発現の強さと軟骨変性の進行度とは負の相関を持つと考えられた。



### 図 3 マウス膝関節における S100A1 タンパクの発現解析

(3) S100A1 が軟骨変性を抑制する可能性がこれまでの研究で示されていたが、そのメカニズムは不明であった。これを探るため、マウス関節軟骨細胞に対し S100a1 をターゲットとする siRNA を投与し、リアルタイム RT-PCR によって遺伝子発現の変化を調べた (図 4)。その結果、Sox9、及びその下流で働く主要な軟骨マトリクス分子である Col2a1 と Aggrecan の有意な発現低下が認められた。更に、関節軟骨表面での潤滑を司る LUBRICIN をコードする遺伝子である Proteoglycan4 (Prg4) も発現低下していた。この事から、S100A1 は関節軟骨に対する pro-anabolic な作用を介して、軟骨変性に対して保護的に働いている可能性が示唆された。

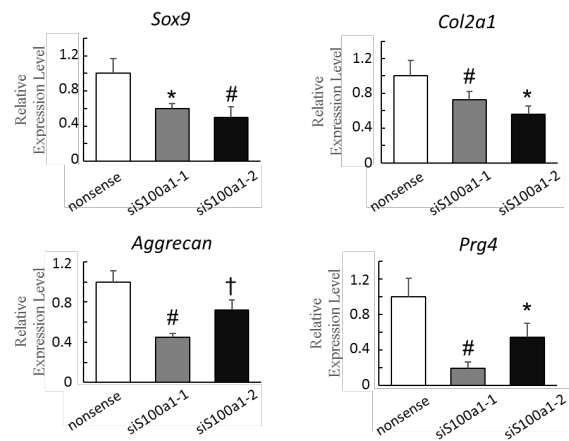
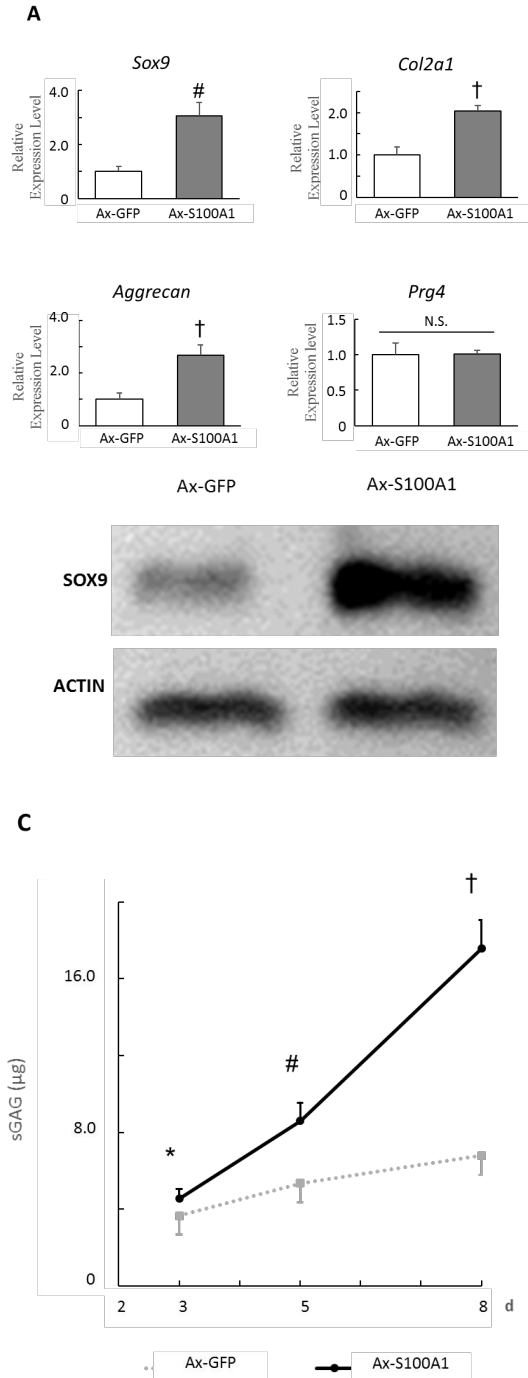


図 4 S100a1 ノックダウンの関節軟骨 anabolism に与える影響の解析 (\*  $P < 0.05$ , #  $P < 0.005$ )

(4) マウス関節軟骨細胞に対し Ax-S100A1、又はコントロールとして Ax-GFP を投与した。ウェスタンブロットにより、Ax-S100A1 を投与した場合のみ S100A1 タンパクの発現が上昇する事を確認した。リアルタイム RT-PCR によって遺伝子発現の変化を調べた所、Ax-S100A1 を投与した群で、Ax-GFP を投与した群に比して Sox9、Col2a1、及び Aggrecan の発現が有意に上昇していた (図 5A)。一方、Prg4 の発現には変化が無かった。

ウェスタンブロットによるタンパクレベルでの発現解析でも、Ax-S100A1 を投与した群で、Ax-GFP を投与した群に比して SOX9 の発現が上昇していた (図 5B)。更に、dye-binding assay では培養上清中の sGAG も Ax-S100A1 を投与した群で有意に上昇しており、アデノウイルスによる S100A1 の過剰発現はタンパクレベルでも基質産生を亢進させると判明した (図 5C)。

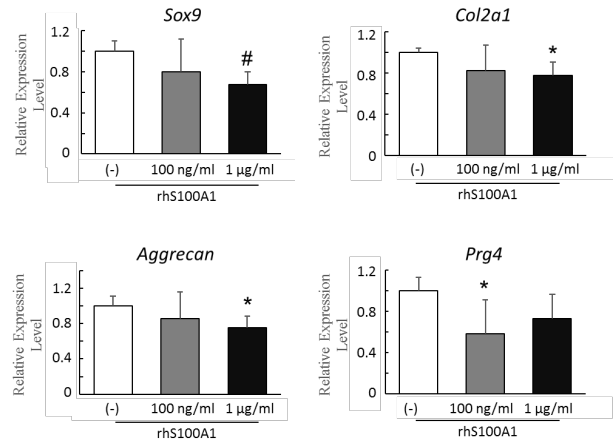
(6) マウス関節軟骨細胞に対して rhS100A1 を 0 ng/ml、100 ng/ml 及び 1 µg/ml の 3 段階の濃度で投与し、リアルタイム RT-PCR によって遺伝子発現の変化を調べた(図 6)。rhS100A1 の投与により、Sox9、Col2a1、及び Aggrecan の発現は rhS100A1 の濃度依存性に減少し、1 µg/ml では発現低下は有意であった。Prg4 の発現は、100 ng/ml では有意に低下していたが、1 µg/ml では変化が無かった。



**図 5 アデノウイルスによる S100A1 過剰発現が関節軟骨の anabolism に与える影響の解析 (\* P<0.05、# P<0.005、† P<0.0005)**

(6) S100 タンパクには、細胞内で標的タンパクと結合して機能を発揮する細胞内作用と、細胞膜表面受容体への結合を介して機能を発揮する細胞外作用の双方がある。細胞内作用と細胞外作用の比率は、アデノウイルスでの過剰発現では相対的に細胞内作用寄りとなり、リコンビナントタンパクの投与では相対的に細胞外作用寄りとなると考えられる。この事を踏まえると、S100A1 は、関節軟骨の anabolism を細胞内作用としては亢進し、細胞外作用としては抑制すると推定された。

(7) 以前までの研究と本研究の結果を総合すると、S100A1 は細胞内作用としての pro-anabolic な機能により、関節軟骨変性に対して抑制的に作用している可能性が示唆された。今後、将来的な関節変性疾患治療への応用により近づくため、更に分子メカニズムの解明を進めていく方針である。



**図 6 rhS100A1 投与が関節軟骨の anabolism に与える影響の解析 (\* P<0.05、# P<0.005)**

<引用文献>

Rosario Donato. S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int J Biochem Cell Biol.* 33:637-668, 2001.

Raghunatha R. Yammani, Cathy S. Carlson, Anne R. Bresnick, and Richard F. Loeser. Increase in Production of Matrix Metalloproteinase 13 by Human Articular Chondrocytes Due to Stimulation With S100A4. Role of the Receptor for Advanced Glycation End Products. *Arthritis Rheum.* 54(9):2901-2911, 2006.

Denise L. Cecil, Kristen Johnson, John Rediske, Martin Lotz, Ann Marie Schmidt, and Robert Terkeltaub.

Inflammation-induced chondrocyte hypertrophy is driven by receptor for advanced glycation end products. *J Immunol.* 175(12):8296-8302, 2005.  
Rik F. P. Schelbergen, Arjen B. Blom, Martijn H. J. van den Bosch, Annet Sløetjes, Shahla Abdollahi-Roodsaz, B. Wim Schreurs, John S. Mort, Thomas Vogl, Johannes Roth, Wim B. van den Berg, and Peter L.E. M. van Lent. Alarmins S100A8 and S100A9 elicit a catabolic effect in human osteoarthritic chondrocytes that is dependent on Toll-like receptor 4. *Arthritis Rheum.* 64(5):1477-1487, 2012.  
Motoshige Nakashima, Tadahiro Sakai, Hideki Hiraiwa, Takashi Hamada, Takaaki Omachi, Yohei Ono, Norio Inukai, Shinya Ishizuka, Tetsuya Matsukawa, Tomoyuki Oda, Akira Takamatsu, Satoshi Yamashita, and Naoki Ishiguro. Role of S100A12 in the pathogenesis of osteoarthritis. *Biochem Biophys Res Commun.* 422(3):508-514, 2012.  
Taku Saito, Toshiyuki Ikeda, Kozo Nakamura, Ung-il Chung, and Hiroshi Kawaguchi. S100A1 and S100B, transcriptional targets of SOX trio, inhibit terminal differentiation of chondrocytes. *EMBO Rep.* 8(5):504-9, 2007.  
Yoshifumi Mori, Daisuke Mori, Ung-il Chung, Sakae Tanaka, Jörg Heierhorst, Thierry Buchou, Jacques Baudier, Hiroshi Kawaguchi, and Taku Saito. S100A1 and S100B are dispensable for endochondral ossification during skeletal development. *Biomed Res.* 35(4):243-250, 2014.  
S. Kamekura, K. Hoshi, T. Shimoaka, U.I. Chung, H. Chikuda, T. Yamada, M. Uchida, N. Ogata, A. Seichi, K. Nakamura, and H. Kawaguchi. Osteoarthritis development in novel experimental mouse models induced by knee joint instability. *Osteoarthritis Cartilage.* 13(7): 632-41, 2005.

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Hiroshi Kobayashi, Song Ho Chang, Daisuke Mori, Shozo Itoh, Makoto Hirata, Yoko Hosaka, Yuki Taniguchi, Keita Okada, Yoshifumi Mori, Fumiko Yano, Ung-il Chung, Haruhiko Akiyama, Hiroshi Kawaguchi, Sakae Tanaka, and

Taku Saito: Biphasic regulation of chondrocytes by RelA through induction of anti-apoptotic and catabolic target genes. *Nat Commun.* 2016;7:13336. doi: 10.1038/ncomms13336.

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

森 芳史 (MORI, Yoshifumi)  
東京大学・医学部附属病院・登録研究員  
研究者番号：60757954

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

##### (4) 研究協力者