

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：17102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06483

研究課題名(和文)変形性関節症における新しい病態機序-Transthyretin性アミロイド沈着-

研究課題名(英文) transthyretin deposition in the pathogenesis of osteoarthritis

研究代表者

赤崎 幸穂 (Akasaki, Yukio)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：60568963

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)：本研究では、変形性関節症におけるTransthyretin(TTR)アミロイド沈着のメカニズムと病態への関与について検討した。関節液中のTTRは、血清と同程度の濃度であった。軟骨組織培養中にアミロイド原性TTRを添加することで、組織学的にGAGの低下を認めた。また、細胞生存アッセイにてTTRの添加により軟骨組織中の軟骨細胞死を多く認めた。TTRトランスジェニックマウスでは、軟骨変性の進行を有意に認め、また、免疫染色にて変性軟骨にはTTRの沈着を有意に認めた。本研究の結果より、関節液中のTTRの軟骨沈着は、軟骨変性の原因となることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to examine the mechanism of Transthyretin (TTR) deposition in the cartilage and its impact on the pathogenesis of osteoarthritis. The concentration of TTR in the synovial fluid was comparable to that in the serum. Amyloidogenic TTR reduced the GAG amount and increased cell death in the cartilage tissue. TTR transgenic mice showed early cartilage degradation accompanied with the deposition of TTR. In conclusion, the deposition of TTR in the cartilage could cause the cartilage degradation.

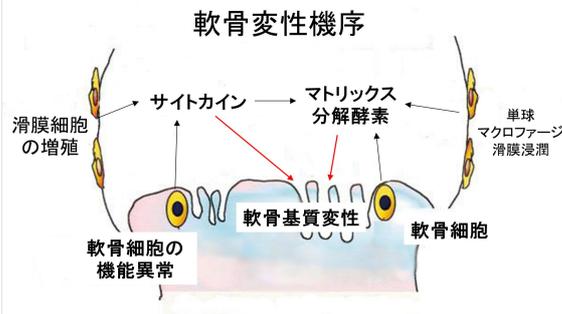
研究分野：整形外科

キーワード：transthyretin amyloid osteoarthritis

1. 研究開始当初の背景

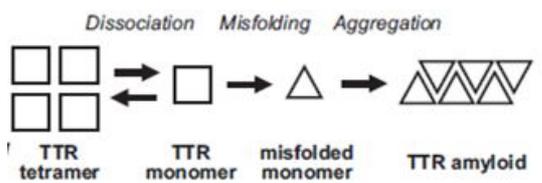
変形性関節症は、進行性の軟骨変性により関節機能を著しく障害する有痛性疾患であり、日本だけでも約1,500万人、世界では約2億人いるとされ、QOL低下ひいては要介護の原因となる最も多い関節疾患である。未だ疾患修飾性治療薬はなく、末期例に対してのみ人工関節置換術が施行されている。人工関節置換術の手術成績は、臨床・基礎研究により向上を続けているが、進行期における変形性関節症の軟骨変性防止に関してはまだ多くの課題が残されており、変形性関節症のさらなる病態機序解明と、その病期進行を抑制する試みが世界的に盛んに行われている。

変形性関節症の関節内では、加齢に伴う軟骨細胞や滑膜細胞の機能異常に起因するサイトカインやマトリックス分解酵素の産生亢進により、軟骨基質であるコラーゲンやプロテオグリカンが分解され、軟骨変性が進行する【図】。



抗サイトカイン薬やプロテアーゼ阻害薬が変形性関節症治療薬として期待されたが、副作用などの問題で臨床応用には至っていない。そのため、今後の変形性関節症の治療法の開発には、新しい病態形成機序の解明が不可欠であり、加齢に伴う軟骨基質変性および細胞機能異常についてのさらなる詳細な検討が重要である。

近年、加齢に伴う疾患群において、アミロイド生成性蛋白の組織沈着の病的意義が注目されている。約30あるアミロイド生成性蛋白のうち、Transthyretin (TTR) が重要な生理活性を呈して、細胞機能異常や組織変性に深く関与することが明らかにされている (Buxbaum, J. N. et al. Cell Mol Life Sci 2009)。TTRは、主に肝細胞で産生され、サイトキシンなどの担体となる血漿蛋白で4量体として機能する。組織において炎症性刺激や酸化ストレスにより、TTRが不安定化し、単量体へと分解される。



TTR単量体の misfold に伴い、TTR性アミロイドが形成され (Reixach, N. et al. PNAS 2004)、細胞活性低下および細胞死の誘導や炎症反応の惹起などのさまざまな生理活性の原因となり、組織変性が進行する。

変形性関節症の軟骨組織においても、古くよりアミロイド沈着の報告はされているが (Ladefoged, C. Ann Rheum Dis 1986) その病的意義についての詳細な検討は行われていない。そこで、本研究の先行実験として、若年者と高齢者および変形性関節症の関節軟骨におけるアミロイドおよびTTRの沈着についての比較検討を行った。

変形性関節症軟骨は、全例でアミロイドとTTRの両方の沈着を広範囲に認め、正常軟骨との比較において統計的にも有意であることを確認した。また、TTR以外のアミロイド生成性蛋白である Serum Amyloid A および 2-microglobulin についても、軟骨組織を免疫染色にて比較し、TTRが最も高率にアミロイドと一致して、変性軟骨に沈着していることを確認した。

2. 研究の目的

本研究では、先行実験で認めた変形性関節症軟骨における Transthyretin (TTR) 性アミロイド沈着の病的意義について検証するために、(1) 変形性関節症軟骨における TTR 沈着のメカニズム、(2) TTR による軟骨細胞の代謝活性および遺伝子発現に対する影響および TTR を安定化させる薬剤の効果、(3) TTR トランスジェニックマウスにおける軟骨変性と治療薬の効果を解明する。

3. 研究の方法

(1) 変形性関節症軟骨における TTR 沈着のメカニズム

人工関節置換術時に変形性関節症患者の関節液を採取し、ヒアルロニダーゼ処理後の希釈サンプルを ELISA 法にて、関節液内の TTR 濃度を測定し、血清濃度 20~40mg/dl と比較検討する。多方面からの検討として、局所産生、すなわち軟骨細胞や滑膜細胞などの関節内の細胞も TTR を産生する可能性があるため、ヒト軟骨細胞および滑膜細胞における TTR の発現の有無と炎症性サイトカイン刺激 (IL-1 など) による増強効果を RT-PCR およびウエスタンブロット法にて解析する。

(2) TTR による軟骨細胞の代謝活性および遺伝子発現に対する影響および TTR を安定化させる薬剤の効果

recombinant TTR を LPS removal kit で処理し、LPS を除去する。さらに、実験毎に Polymyxin B を添加することで、LPS の混入による影響を徹底的になくす対策をとる。以上のように前処理した recombinant TTR の濃度、作用時間で条件を分けて、軟骨組織およ

び軟骨細胞の培養液に添加し、RT-PCR 法にて IL-6 などの炎症性サイトカインや MMP-13 および ADAMTS-4 などのプロテアーゼの遺伝子発現の変化を測定する。また、軟骨組織では培養液中への GAG 濃度の測定や細胞死アッセイを行う。続いて、TTR の構造を 4 量体に安定化させる効果を有する薬剤である Diflunisal、Tafamidis、Resveratrol の 3 つで recombinant TTR を処理して、培養軟骨細胞に作用させ、同様に RT-PCR にて遺伝子発現の変化を測定し、TTR の作用の阻害効果を確認し、治療薬の候補を検討する。

(3) TTR トランスジェニックマウスにおける軟骨変性と治療薬の効果

TTR トランスジェニックマウスの 6 か月、12 か月、24 か月齢の膝関節の組織解析を行う。また、膝内側半月板切離による変形性関節症モデルを作成し、その 8 週間後の膝関節を同様に組織解析する。有意な差を認める場合は、TTR を安定化する薬剤 (Diflunisal および Tafamidis) による変形性関節症モデルに対する治療効果の検討を行う。

4. 研究成果

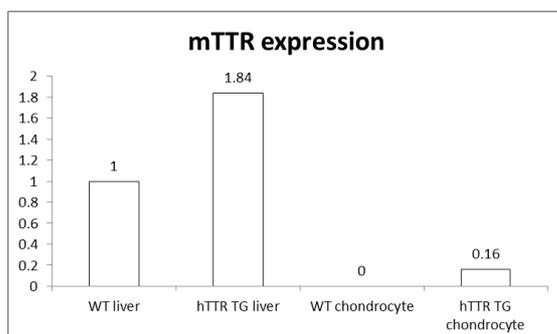
(1) 変形性関節症軟骨における TTR 沈着のメカニズム

人工関節置換術時に変形性関節症患者の関節液内の TTR 濃度を測定し、血清濃度 20 ~ 40mg/dl と同程度であった。局所産生、すなわち軟骨細胞や滑膜細胞などの関節内の細胞では TTR の発現は炎症性サイトカイン刺激下でもほとんどなく TTR の産生には関わっていないかった。【下表】

TTR PCR サイクル数 (IL6 刺激ありなし)

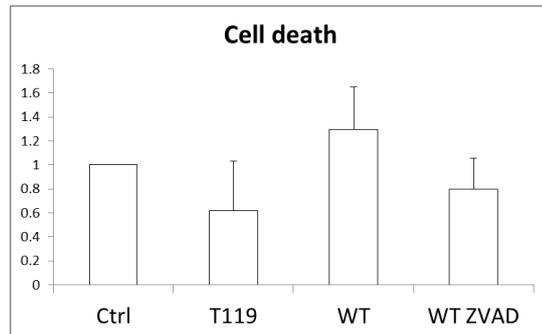
		GAPDH	TTR
軟骨細胞	Ctrl	19.21	35.75
	IL6	18.79	36.4
HepG2	Ctrl	18.58	21.15
	IL6	18.91	22

また、マウスの肝臓と軟骨組織における TTR の発現量を PCR で確認したところ、肝臓での著明な発現と比較し、軟骨組織ではほとんど発現を認めなかった。【下図】以上より、関節内の TTR は肝臓で産生され、血清と同程度関節内に存在すると考えられた。

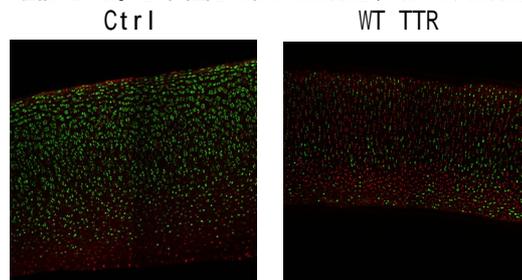


(1) TTR による軟骨細胞の代謝活性および遺伝子発現に対する影響および TTR を安定化させる薬剤の効果

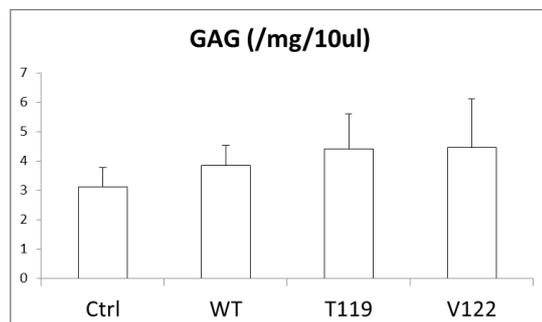
培養液中に添加した WT-TTR は、軟骨細胞の細胞死を有意に増加させる。一方、安定化 TTR である T119 TTR は細胞死を誘導しない。WT TTR とカスパーゼ阻害薬 (ZVAD) を同時に添加すると軟骨細胞の細胞死がなくなるため、TTR はアポトーシスを誘導することが示された。【下図】



続いて、ウシの軟骨組織の組織培養中に、WT TTR を添加し、Live Dead assay にて TTR による軟骨細胞の細胞死増加を組織内でも確認した。【下図】緑が生細胞、赤は死細胞

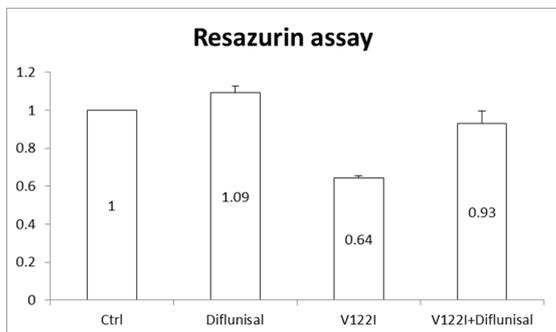


その培養液中の GAG 濃度を測定すると、TTR 添加により、培養液中への GAG の遊離量が増加した。TTR により、軟骨基質の分解、すなわち軟骨細胞のアグリカネース活性の増加を誘導することが示唆された。【下図】



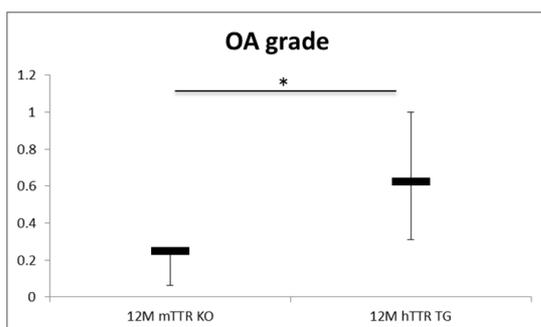
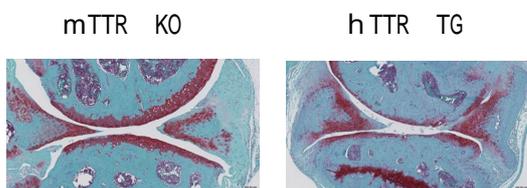
TTR が安定型である 4 量体から、アミロイド原性となる単量体への分解を抑制する効果が知られている Diflunisal を使用して、TTR の細胞毒性のレスキュー試験を行った。TTR の不安定型である V112 と同時に Diflunisal を軟骨細胞に作用させると、

Diflunisal は TTR による軟骨細胞の細胞活性低下を阻害することが示された。【下图】

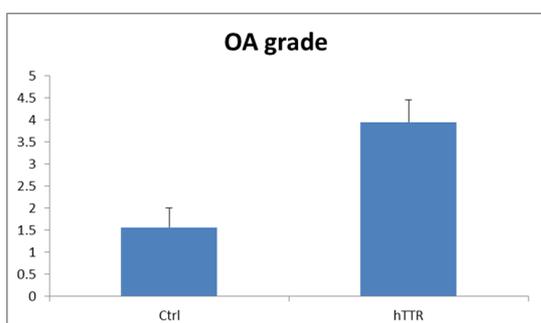


(3) TTR トランスジェニックマウスにおける軟骨変性

TTR トランスジェニックマウスを用いて変形性関節症モデルを作成し、wild type マウスと比較することで軟骨変性程度を評価した。12カ月齢では、TTR トランスジェニックマウスで、軟骨変性を有意に認めた。



TTR マウスで変形性関節症モデル作成後 8 週間で軟骨変性の進行を有意に認め、また、免疫染色にて変性軟骨には TTR の沈着を有意に認めた。TTR マウスの変性軟骨では、IL6 や MMP13 の発現の亢進を認めた。本研究の結果より、TTR の軟骨沈着は、軟骨変性の原因となることが示唆された。



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 0 件)

〔学会発表〕(計 5 件)

第 31 回日本整形外科学会基礎学術集会
(2016.10.13-14 福岡)
変形性関節症における transthyretin 性アミロイド沈着の病的意義
赤崎幸穂, Martin K. Lotz, 岡崎 賢, 岩本幸英

第 8 回日本関節鏡・膝・スポーツ整形外科学会 (2016.7.28-30 福岡)
軟骨変性過程における Transthyretin 性アミロイド沈着の病的意義の検討
赤崎幸穂, Martin K. Lotz, 岡崎 賢, 水内秀城, 岩本幸英

第 89 回日本整形外科学会学術総会
(2016.5.12-15 横浜)
変形性関節症における Transthyretin 性アミロイド沈着の病態意義の検討
赤崎幸穂, Martin K. Lotz, 岡崎 賢, 岩本幸英

第 60 回日本リウマチ学会総会学術集会
(2016.4.21-23 横浜)
変性軟骨過程における Transthyretin 性アミロイド沈着の病態意義の検討
赤崎幸穂, 岡崎 賢, 岩本幸英

第 29 回日本軟骨代謝学会
(2016.2.19-20 広島)
変性軟骨における Transthyretin 性アミロイド沈着
赤崎幸穂, Martin K. Lotz, 岡崎 賢, 岩本幸英

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.ortho.med.kyushu-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

赤崎 幸穂 (AKASAKI, Yukio)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：60568963